



**TERMOFİLİK BAKTERİLERDEN LİPAZ ÜRETİCİSİ SUŞLARIN
BELİRLENMESİ, ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BİYOTEKNOLOJİK
UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

İkra ÖZKAN

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

2020

(Her hakkı saklıdır.)

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TERMOFİLİK BAKTERİLERDEN LİPAZ ÜRETİCİSİ SUŞLARIN
BELİRLENMESİ, LİPAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

(Determination of Lipase Producer from Thermophilic Bacteria and Purification of Enzyme,
Characterization and Investigation of Biotechnological Applicability)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İkra ÖZKAN

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Erzurum
Temmuz, 2020

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

İkra Özkan tarafından hazırlanan “Termofilik Bakterilerden Lipaz Üreticisi Suşların Belirlenmesi, Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliğinin Araştırılması” başlıklı çalışması 06/07/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
Atatürk Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Ayşenur YAZICI
Erzurum Teknik Üniversitesi

Enstitü Yönetim Kurulunun
....../....../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında sunulan “Termofilik Bakterilerden Lipaz Üreticisi Suşların Belirlenmesi, Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliğinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	6	30
Kuramsal Temeller	1	30
Materyal ve Yöntem	8	35
Bulgular	2	20
Tartışma	5	20
Tezin Geneli	7	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
İkra ÖZKAN	Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
7.7.2020	7.7.2020
İmza:	İmza:

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak hazırladığım bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında Prof. Dr. Ahmet **ADIGÜZEL** danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca beni her konuda destekleyen ve çalışmalarımı başarılı bir şekilde yürütebilmem adına bana birçok imkanı sağlayan, benim her anlamda destekcim olan danışman hocam ve aynı zamanda Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. **Ahmet ADIGÜZEL**'e gösterdiği ilgi ve hoşgöründen dolayı şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımı yürütürken bilgi ve tecrübesine başvurduğum, zorlandığım tüm zamanlarda beni motive eden ve kıymetli zamanımı ayırıp, değerli fikirlerini her an benimle paylaşan; ayrıca güler yüzünü benden hiç eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Melda **ŞİŞECİOĞLU**'na, çalışmamın bütün aşamalarındaki yardımlarından ve desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel aşamalarda karşılaştığım tüm sorunları çözmek için bilgilerine başvurduğum, bölümdeki sığındığım liman olan, değerli hocam Sayın Arş. Gör. Dr. Mustafa **Özkan BALTACI**'ya yardımlarından ve ilgilerinden ötürü teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında, geç saatlere kadar beni yalnız bırakmayıp yardımlarını, dostluğunu, desteğini esirgemeyen kıymetli arkadaşım Sayın Esra **ALÇİÇEK**'e, tez yazım sürecinde, benimle beraber yaşadığım zorlukları yaşayan, bana ailem gibi gönlünü açıp, beni destekleyen canım arkadaşım, dostum Sayın Emrah **POLAT**'a çok ama çok teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Son olarak; hayatımın her anında desteklerini, güvenlerini ve sonsuz sevgilerini her daim hissettiğim; dua ve sabırlarıyla benim hep yanımda olan canım annem Hadiye **ÖZKAN**'a, sürekli çocukları için mücadele eden en büyük desteğim olan değerli babam Ramazan **ÖZKAN**'a ve varlığına şükrettiğim, beni her daim güldürebilen, biricik kardeşim Arda **ÖZKAN**'a hep yanımda oldukları için sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İkra ÖZKAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERMOFİLİK BAKTERİLERDEN LİPAZ ÜRETİCİSİ SUŞLARIN BELİRLENMESİ, ENZİMİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

İkra ÖZKAN

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Amaç: Termofilik koşullardan sıcak su kaynaklarından temin edilen su ve çamur örneklerinde gelişim gösteren bakteri suşlarının izolasyonunun yapılması; bu suşlar içerisinde yüksek derecede lipaz üretimini yapan suşun belirlenip, bu test suşunun identifikasyon ve moleküler karakterizasyonunun yapılması lipaz üreten suşun belirlenip, lipaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknoloji alanında uygulanabilirliği amaçlanmıştır.

Yöntem: Erzurum Ilıca termal kaplıcasından alınan su ve çamur örneklerinden 11 adet termofilik bakterinin izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra bu suşlardan en iyi lipolitik aktivite gösteren IO3 izolatu seçilerek, identifikasyon aşamasına geçildi. Yapılan konvensiyonel analizler sonucunda, test suşunun %2-4 tuz konsantrasyonunda, pH: 7,0-9,0'da ve 45-55°C sıcaklık değerlerinde iyi gelişebildiği, katalaz, endospor, gram, oksidaz pozitif, hareketli ve çubuk hücre morfolojisine sahip olduğu tespit edildi. 16S rRNA sekans analizi sonucunda test izolatının, %99 oranında *Aeribacillus pallidus*'a benzerlik gösterdiği belirlendi. Daha sonra IO3 suşundan, ekstraselüler olarak sentezlenen lipaz enzimi iki farklı strateji ile saflaştırıldı ve biyokimyasal karakterizasyonu yapıldı.

Bulgular: İlk aşamada enzim, geleneksel saflaştırma metotları olan amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile %3,18 verimle 9,3 kat saflaştırıldı. İkinci aşamada ise, biyomoleküllerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için kullanılan yeni bir yöntem olan üçlü faz ayırma (TPP) sistemi ile %38,79 verimle, 1,54 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 33,88 kDa, optimum pH'sı 8,0 ve sıcaklık değeri ise, 50°C olarak belirlendi. Enzimin 20-80°C'lik sıcaklık değerleri arasında ve 120 dakikalık inkübasyon süresi sonunda, özellikle 70 ve 80°C sıcaklık değerlerinde kararlılığını sırasıyla; %69 ve %45 oranında muhafaza ettiği tespit edildi. *A. pallidus* IO3'ten saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde; Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ iyonları varlığında enzimin aktivitesini artırdığı gözlemlenirken; Li⁺ ve Cu²⁺ iyonları varlığında ise, enzimin kararlılık sergilediği gözlemlendi. Enzimin aktivitesini yüzey aktif maddelerin varlığında yüksek oranda artırdığı, organik çözücülerden kloroform varlığında ise, aktivitesinde %22 ve %338 oranında artış gösterdiği tespit edildi. Enzim, en yüksek aktiviteyi paranitrofenol palmitat substratı için gösterdi. Lipaz enziminin DNTB, IAA ve EDTA ile tamamen inhibe olduğu belirlendi. β -Merkaptaetanol varlığında ise enzimin aktivitesini düşük seviyede koruduğu gözlemlendi. Bu enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 2,75 mM ve 30,77 μ mol.mL⁻¹.dk⁻¹ olarak hesaplandı.

Sonuç: Elde edilen enzimin sıvı ticari deterjanlarda aktivitesini koruduğu ve bitkisel kaynaklı lekeleri tamamen, hayvansal nitelikli yağlarla kontamine olmuş kumaş yüzeylerini ise, kısmen temizlediği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Termofilik Bakteri, İzolasyon, İdentifikasyon, Lipaz, Saflaştırma, Enzim Karakterizasyonu.

Temmuz 2020, 103 Sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

DETERMINATION OF LIPASE PRODUCER FROM THERMOPHILIC BACTERIA AND PURIFICATION OF ENZYME, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF BIOTECHNOLOGICAL APPLICABILITY OF LIPASE ENZYME

İkra ÖZKAN

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Purpose: Isolation of bacterial strains developing in water and mud samples obtained from hot water sources from thermophilic conditions; The purpose of this study was to determine the strain producing high levels of lipase from these strains, identification and molecular characterization of this test strain.

Method: In this thesis study; isolation of 11 thermophilic bacteria from the water and sludge samples obtained from the Erzurum İlica thermal spring were performed. Then, the IO3 isolate showing the best lipolytic activity among these strains was selected and the identification stage was started. As a result of conventional analyzes performed, it was determined that the test strain can develop well at 2-4% salt concentration, pH: 7.0-9.0 and 45-55 °C temperature values, it is catalase, endospore, gram and oxidase positive and it has mobile and rod cell morphology. As a result of 16S rRNA sequence analysis, it was designated that the test isolate was 99% similar to *Aeribacillus pallidus*. Afterwards, lipase enzyme synthesized extracellularly from strain IO3 was purified by two different strategies and biochemical characterization was performed.

Findings: In the first stage, the enzyme was purified 9.3 fold with 3.18% yield by traditional purification methods, which are ammonium sulfate precipitation, ion exchange and gel filtration chromatography. In the second stage, it was purified 1.54 fold with 38.79% yield by a three-phase separation (TPP) system, which is a new method used for extraction and purification of biomolecules. It was found that the molecular mass of the enzyme determined with SDS-PAGE is approximately 33.88 kDa, optimum pH of the enzyme is 8.0 and optimum temperature of the enzyme is 50°C. It was determined that the stability of the enzyme at temperatures between 20-80°C and at the end of the 120 minute incubation period was preserved especially at 70 and 80°C with 69% and 45%, respectively. When the effect of metal ions on the activity of lipase enzyme purified from *A. pallidus* IO3 was examined, it was observed that while the enzyme increased its activity in the presence of Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ ions, the enzyme exhibited stability in the presence of Li⁺ and Cu²⁺ ions. It was found that the enzyme increased its activity in the presence of surface active agents and increased its activity by 22% and 338% in the presence of chloroform which is a organic solvent. The enzyme showed the highest activity for the paranitrophenol palmitate substrate. It was determined that the lipase enzyme was completely inhibited by DNTB, IAA and EDTA. In the presence of β -mercaptaethanol, it was observed that the enzyme maintained its activity at a low level. K_m and V_{max} values for this enzyme were calculated as 2.75 mM and 30.77 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectively.

Results: It was observed that the enzyme obtained retains its activity in liquid commercial detergents and partially cleans the fabric surfaces that are contaminated with vegetable oils and partially contaminated with animal oils.

KeyWords: Thermophilic Bacteria, Identification, Isolation, Lipase, Purification, Characterization of Enzyme.

July 2020, 103 Pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ.....	1
Termofilik Bakteriler	1
Termofilik Bakterilerin Tanılanması.....	2
Enzimler	3
Lipazlar	4
Mikrobiyal Lipazlar	7
Bakteriyal lipazlar	9
Termofilik lipazlar	11
Lipazların Kullanım Alanları	12
Lipazların Kullanıldığı Güncel ve Temel Biyoteknolojik Uygulamalar.....	12
Yeni biyopolimer materyal sentezinde.....	12
Biyodizel üretiminde	12
Lipazların Endüstriyel Uygulamaları	13
Enzimlerin Saflaştırılması	14
Tezin Amacı	15
KURAMSAL TEMELLER.....	16
MATERYAL VE YÖNTEM	21
Materyal	21
Kullanılan kimyasallar	21
Kullanılan Cihazlar	22
Besiyerleri	23
<i>Tribütirin Agar Besiyeri:</i>	23
Yöntem.....	27
Termofilik bakterilerin izolasyonu.....	27

İzole edilen bakterilerden lipaz enzimi üreten izolatların, tribütirin agar besiyerinde belirlenmesi	27
Seçilen İzolatın Konvensiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi	28
Morfolojik özelliklerin belirlenmesi	28
Gram boyama	28
Endospor boyama.....	28
Hareketlilik testi	29
İzolatın Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	29
İzolatın gelişim gösterdiği tuz konsantrasyonunun belirlenmesi	29
İzolasyonu yapılan bakterinin gelişim gösterebildiği sıcaklık aralığının belirlenmesi ...	29
İzolasyonu yapılan bakterinin gelişim gösterdiği pH aralığının belirlenmesi	29
İzolasyonu Yapılan Bakterinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	29
Katalaz testi.....	29
Oksidaz testi	30
Test Suşunun Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu	30
Genomik DNA izolasyonu.....	30
16S rRNA PCR analizi	30
16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi	31
Klonlama	32
DNA dizi analizi	34
Sonuçların Değerlendirilmesi.....	35
Enzim Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları.....	35
Lipaz enzimini üreten IO3 suşundan ön kültür hazırlanması.....	35
Test izolatının lipaz besiyerinde üretilmesi.....	35
Enzim homojenatının hazırlanması.....	35
Enzim aktivite tayini metodu	35
Kantitatif protein tayini	36
Kalitatif protein tayini metodu	37
<i>Aeribacillus pallidus</i> IO3'ten lipaz enziminin saflaştırılması.....	37
SDS PAGE ile enzimin saflığının ve molekül kütlesinin belirlenmesi	39
Örneklerin gümüş boyama metodu ile boyanması.....	40
<i>A.pallidus</i> IO3 Bakterisinden Saflaştırılan Lipaz Enzimi İçin Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	41
Lipaz enzimi için optimum ph ve stabil ph belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar ..	41

Lipaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklık değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar.....	41
Bazı metal iyonlarının <i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar	42
Bazı organik çözücülerin <i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar	42
Bazı inhibitörlerin <i>A. pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar	42
<i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine bazı sürfaktanların ve okside edici ajanın etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar	43
<i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesini belirlemeye yönelik çalışmalar	43
<i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi için K_m ve V_{max} kinetik parametrelerini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar	43
Ticari Olarak Piyasada Satılan Bazı Katı ve Sıvı Deterjanların <i>A.pallidus</i> IO3 Bakterisinden Saflaştırılan Lipaz Enzimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	44
Yağ lekelerinin gideriminde saflaştırılan lipaz enziminin kullanımı	44
Verilerin İstatistiksel Analizi	44
ARAŞTIRMA BULGULARI	45
Termofilik Bakterileri İzolasyonu.....	45
Lipaz Enzim Üreten Bakterilerin Tribütirin Agar Besiyerinde Belirlenmesi	45
Genomik DNA izolasyonu.....	46
16S rRNA PCR	46
DNA dizi analizi	46
<i>A.pallidus</i> IO3'ten Lipaz Enziminin Saflaştırılması	47
Lipaz Eziminin Geleneksel Saflaştırma Metotları ile Saflaştırılması	47
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	47
İyon Değişim Kromatografisi	47
Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	48
Lipaz Eziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Saflaştırılması.....	49
TPP sisteminde amonyum sülfat konsantrasyonu ve organik çözücü oranının etkisinin belirlenmesi	49
<i>A.pallidus</i> IO3 lipazının saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi.....	52
SDS-PAGE ile Enzimin Saflık Kontrolü ve Molekül Kütlesi Tayini.....	53

Enzim Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları	54
Lipaz enzimi için optimum pH ve stabil pH'nın bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar	54
Lipaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklığın bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmaları	55
Bazı metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzimine etkisini belirlemeye yönelik elde edilen sonuçlar	57
Bazı inhibitörlerin saflaştırılan lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar.....	58
Bazı organik çözücülerin <i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar	58
<i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi üzerine sürfaktanların ve okside edici ajannın etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar	59
<i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar.....	60
K_m ve V_{max} parametrelerinin bulunmasına yönelik sonuçlar	61
<i>A.pallidus</i> IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi aktivitesi üzerine bazı endüstriyel deterjanların etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışma sonuçları	61
Yağ lekelerinin gideriminde saflaştırılan lipaz enziminin etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların sonuçları.....	62
TARTIŞMA SONUÇ	65
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Lipazların genel hidroliz ve sentez reaksiyonu.....	6
Şekil 2. Protein tayini için kullanılan standart BSA grafiği.....	37
Şekil 3. Tribütirin agar besiyerinde lipaz üreticisi suşun lipaz aktivite görüntüsü ve zon oluşumu.	45
Şekil 4. Filogenetik ağaç	46
Şekil 5. Saflaştırılan lipaz enziminin iyon değişim kromatografisi kalitatif protein tayini sonuçları (280 nm) ve lipaz enzimi aktivitesi sonuçları (410 nm) grafiği	47
Şekil 6. Saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi kalitatif protein tayini sonuçları (280 nm) ve jel filtrasyon kromatografisi enzim aktivitesi tayini sonuçları (410nm)	48
Şekil 7. TPP metodunun %20 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı t-bütanol oranının (Homojenat:t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi	49
Şekil 8. TPP metodunun %30 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat:t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi	50
Şekil 9. TPP metodunun %40 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat:t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi	50
Şekil 10. TPP metodunun %50 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	51
Şekil 11. TPP metodunun %60 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	51
Şekil 12. TPP metodunun %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	52
Şekil 13. TPP metodunun %80 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi.....	52
Şekil 14. A.pallidus IO3 lipazının saflaştırılmasında TPP metoduna pH'nın etkisi	53
Şekil 15. SDS-PAGE sonucu çizilen log MK-R _f grafiği.....	54

Şekil 16. SDS-PAGE Görüntüsü. M) Marker 1) Homojenat 2) TPP Alt-Faz 3) TPP Ara-Faz 4) İyon Değişim Kromatografisi 5) Jel Filtrasyon Kromatografisi.....	54
Şekil 17. Lipaz enziminin optimum pH'sı için oluşturulan ölçüm grafiği.....	55
Şekil 18. Lipaz enziminin stabil pH'sı için oluşturulan ölçüm grafiği	55
Şekil 19. Lipaz enziminin optimum sıcaklığı için oluşturulan ölçüm grafiği	56
Şekil 20. Lipaz enziminin stabil sıcaklığı için oluşturulan ölçüm grafiği.....	56
Şekil 21. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi (1 mM).....	57
Şekil 22. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi (10 mM).....	57
Şekil 23. Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde lipaz aktivitesi üzerine etkisi (%25'lik konsantrasyon ve %50'lik konsantrasyon).....	59
Şekil 24. Lipaz enzimi üzerine bazı sürfaktanların ve okside edici ajanın etkisi (%1'lik konsantrasyon)	60
Şekil 25. Lipaz enzimi üzerine sürfaktanların ve okside edici ajanın etkisi (%5'lik konsantrasyon)	60
Şekil 26. Lipaz enziminin substrat spesifitesi için aktivite sonuçları	61
Şekil 27. Lipaz enziminin K_m ve V_{max} parametrelerinin belirlenmesine yönelik Lineweaver-Burk grafiği	61
Şekil 28. Çörekotu yağı, bebek yağı, zincir yağı, çikolata ve yemek yağı lekelerinin hazırlanması (resimlerdeki sırasıyla)	62
Şekil 29. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin çörekotu yağı lekesi üzerine etkisi.....	63
Şekil 30. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin bebek yağı lekesi üzerine etkisi	63
Şekil 31. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin makine ve bisiklet zincir yağı lekesi üzerine etkisi	63
Şekil 32. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin çikolata lekesi üzerine etkisi	64
Şekil 33. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin yağlı yemek lekesi üzerine etkisi.....	64

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Literatürde mevcut olan son yıllarda çalışılmış mikrobiyal lipaz kaynakları	9
Tablo 2. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda lipaz üretimi için kullanılan bakteri suşları	10
Tablo 3. Kullanılan kimyasallar ve bileşikler	21
Tablo 4. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	22
Tablo 5. Lipaz üretim besiyeri bileşenleri	23
Tablo 6. PCR Tüpleri Reaktif İçeriği.....	31
Tablo 7. PCR Programı ve Programı ve Sıcaklık Döngüsü.....	31
Tablo 8. Koloni PCR Döngüsü.	34
Tablo 9. İzolatın morfolojik fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	45
Tablo 10. A.pallidus IO3'den geleneksel yöntemler ile saflaştırılan lipaz enziminin saflaştırılma tablosu	48
Tablo 11. A.pallidus IO3'den TPP yöntemiyle saflaştırılan lipaz enziminin saflaştırılma tablosu	53
Tablo 12. Bazı inhibisyon ajanlarının 1 saatlik inkübasyon süresinde lipaz aktivitesi üzerine etkisi (1 mM ve 10 mM)	58
Tablo 13. Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde lipaz aktivitesi üzerine etkisi (Kalan aktivite %25'lik konsantrasyon ve %50'lik konsantrasyon)	59
Tablo 14. Lipaz enziminin ticari deterjanlarda aktivite durumu.....	62

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
BSA	Bovin Serum Albümin
Bç	Baz Çifti
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
DMSO	Dimetil Sülfoksit
E.C.	Enzim komisyon numarası
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EU	Enzim ünitesi
K _m	Enzimin subsrta ilgisini gösteren sabit
kDa	Kilodalton
M	Molar
mM	Milimolar
mA	Miliamper
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorid
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenil
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
V _{max}	Maksimum hız
V	Volt
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

GİRİŞ

Termofilik Bakteriler

Yaşadığımız biyosfer birçok canlı mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Bu organizmalardan birçoğu henüz keşfedilmemiş olup, yaşamsal fonksiyonlarını sürdürebilmek için, değişken çevresel koşullara uyum sağlamak zorundadır. Mikroorganizmaların ve diğer yüksek yapılı organizmaların canlılık faaliyetlerini en iyi şekilde gösterebilmeleri için gereken en önemli çevresel faktörlerden biri sıcaklıktır (Akhmaloka *et al.* 2006).

Termofilik mikroorganizmalar, sıcaklığın genellikle 45°C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde gelişebilen canlılar olup, termofilik bakteriler karasal ve denizel volkanik alanlarda, jeotermal nitelikli deniz sedimentlerinde, hidrotermal menfezlerde, kaplıcalarda ve çeşitli sıcak su kaynaklarında yaşarlar (Caccoma *et al.* 2001; Deive *et al.* 2012).

Bu organizmaların yüksek sıcaklık değerlerine adaptasyonunu sağlayan en büyük etken ise, yapılarında bulunan termostabil nitelikli enzimleridir (Niehaus 1999; Roger *et al.* 2002). Bu enzimler, sadece termostabil olmayıp aynı zamanda yüksek pH, basınç ve tuz konsantrasyonu gibi ekstrem koşullara da adapte olma yeteneklerinden dolayı, endüstri açıdan da oldukça önemlidirler ve sahip oldukları bu özelliklerinden dolayı, günümüzde çok sayıda bilim insanı tarafından yeni izolatların taksonomiye kazandırılması ve biyoteknolojik önemi bulunan enzimlerin tespitine yönelik yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bunun sonucu olarak; termofilik bakteriler proteolitik ve lipolitik enzimlerle endüstriyel alanda, polimeraz enzimleriyle de biyoteknoloji ve gen mühendisliği alanlarında önemli bir yere sahip olmuştur (Gomez and Steiner 2004; Cihan *ve ark.* 2012; Taslimi *et al.* 2013; Baltacı *ve ark.* 2017).

Termofilik mikroorganizmalar, tüm canlılar gibi yaşamlarını devam ettirmek için, bulundukları ortama adapte olmak zorundadırlar.

Bunun için:

- I. Termofillerin proteinleri, kuaterner yapıları olduklarından dolayı, yüksek sıcaklığa ve denatürasyona karşı dayanıklıdır (Kumar and Nussinov 2001).
- II. Şaperon olarak da bilinen özelleşmiş ısı-şoku proteinleri, bu mikroorganizmalar tarafından fazlaca üretilir ve bunlar denatürasyondan sonra proteinlerin tekrar spesifik formda katlanmalarına olanak tanıyıp, özel fonksiyonlarını yeniden kazanmalarını sağlar (Macario Alberto and Macario Everly 2002).

- III. Termofillerin hücre zar yapıları doymuş yağ asitlerinden oluşur. Doymuş yağ asitleri hücreye hidrofobiklik sağlar ve bu durum yüksek sıcaklıklarda hücrenin yaşamasına olanak tanır (Herbert and Sharp 1992).
- IV. Termofillerde DNA giraz enziminin yardımıyla oluşturulan pozitif süper sarmal DNA yapısı bulunur (Lopez 1999). Bu yapı DNA'nın çift sarmal yapısının denatürasyonunu önler.
- V. Termofiller, makromoleküllerinin ve enzimlerinin yapılarında bulundurdıkları elektrostatik disülfür köprüleri ve hidrofobik etkileşimleri kullanarak, yüksek sıcaklığa dayanıklı hale gelirler ve stabil enzim yapıları ile canlılık fonksiyonlarını sürdürürler (Kumar and Nussinov 2001; Güven 2011).

Termofilik Bakterilerin Tanınması

Sistematik, sınıflandırma, isimlendirme ve tanılamayı kapsayan, taksonomiden farklı olarak ilk önce organizmaları benzerlik veya farklılıklarına göre taksonomik gruplara ayırıp, sistemli bir düzen oluşturmaktadır. İki takson arasındaki akrabalık ilişkilerini göstermek için en kısa ve mantıklı yol olan sınıflandırma, sabit bir isimlendirme ve güvenilir bir tanımlama için ön koşul olup, genellikle tanılama ile karıştırılmaktadır. Taksonominin mevcut bileşenlerinden ilki, türlerin ve temel taksonomik birimlerin kimliklendirilmesi, ikinci olarak da bu birimleri sıralayıp kataloglamak için uygun bir ilerleme planının yapılmasıdır. İkincisi ise, isimlendirmedir ve taksonomik bir hiyerarşinin oluşturulmasında kullanılan terimler ile kurallardan oluşmaktadır. İsimlendirilmenin doğru şekilde yapılması için International Nomenclature of Bacteria'da söz edilen uluslararası kurallar ve tanımlanan isimler kullanılmaktadır (Baltacı 2015).

Bakterilerin geleneksel olarak morfolojik, metabolik ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılması, farklı bakteri grupları arasındaki evrimsel ilişkiyi tespit etmede yetersiz kalır. Nükleik asitlerin dizi analiz verilerini temel alan mikrobiyal sistematığın filogeniye katılımıyla, mikroorganizmalar evrimsel özelliklerine göre sınıflandırılabilmiştir. Klasik testler, deneyleri uzun sürmesi, fazla iş gücü gerektirmesi, tecrübeli araştırmacılara ihtiyaç duyulması, ekonomik olmaması ve alınan sonuçların yoruma açık olması gibi birçok dezavantaja sahiptir. Klasik yöntemlerin bu tür dezavantajlarını ortadan kaldırmak için, mikroorganizmaların tanısında moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Moleküler yöntemler, mikroorganizmaları meydana getiren makromoleküllerin içeriklerine, çeşitliliklerine ve oranlarına bağlı olarak tanılama prosesini esas almaktadır. Bu yöntemde karbonhidratlar, lipitler, proteinler, DNA ve RNA çalışma materyali olarak kabul edilir ve bunlardan birinin

veya bunların oluşturduğu kombinasyonlarının kullanımıyla, mikroorganizmaların tanı ve karakterizasyonu gerçekleştirilir (Adıgüzel 2006).

Enzimler

Enzimler, spesifik olarak biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirmek için canlı organizmalar tarafından üretilen biyokatalizörlerdir (Gurung *et al.* 2013). Enzimler, reaksiyonu hızlandırma işini aktivasyon enerjisini düşürerek yapan ve hiçbir değişikliğe uğramadan reaksiyondan aynı şekilde çıkan protein yapılı makro moleküllerdir (Singh *et al.* 2016).

Bir hücrede meydana gelen tüm biyokimyasal ve metabolik olaylar, enzimler ile gerçekleşir. Enzimlerin çoğunluğu protein yapısındadır. Enzimler DNA tarafından şifrelendiği için, dolayısıyla hücredeki biyokimyasal ve metabolik olaylar DNA seviyesinde düzenlenip kontrol edilmektedir (Keha ve Küfrelioğlu 2009).

Enzimler anabolizma ve katabolizma reaksiyonları, hidroliz olayları, enerji metabolizmasında elektron aktarımı gibi biyokimyasal olaylarda sürecin gerçekleştirilmesini sağlayan biyomoleküllerdir (Önal 2010). Enzimler sadece biyokimyasal olayları katalizlemekle kalmazlar; protein degradasyonu, kalıtım materyali olan DNA'nın sentez ve yıkımı işlemleri, hücre içinde protein taşınması, sinaptik uyarıların iletimi ve programlı hücre ölümü olan apoptosis mekanizması gibi hayati olayların da gerçekleştirilmesinden sorumludurlar ve mutlaka katalizini yaptıkları reaksiyona özgül olarak çalışırlar (Whitford 2005). Enzimlerin katalitik özellikleri sadece substrat spesifikliğine ve reaksiyon özgüllüğüne bağlı değildir; substrat konsantrasyonuna, enzim konsantrasyonuna, pH ve sıcaklık faktörlerine de bağlıdır (Javed *et al.* 2018).

Enzimler spesifik oluşları ve yüksek katalitik etkinlik göstermeleri ile kimyasal katalizörlerden daha avantajlıdırlar. Gereksiz yan ürün oluşturmazlar, toksik etkileri yoktur ayrıca istenmeyen yan ürün oluşturmadıklarından dolayı da çevre dostudurlar. Tüm bunlara ek olarak enerji ihtiyaçları ve maliyetlerinin düşük olmaları, ısıya karşı hassas olan substrat yapılarını bozmamaları ile reaksiyon hızını 100 milyon ile 10 milyar kat artırmaları gibi önemli özelliklerinden dolayı endüstriyel alanda da kullanılan önemli biyomoleküllerdir (Önal 2010; Singh *et al.* 2016).

Enzimler Uluslararası Enzim Komisyonu tarafından katalizledikleri reaksiyonlara göre kod numarası verilerek 6 ana sınıfa ayrılırlar:

1. **Oksidoredüktazlar:** Redoks tepkimelerini katalizlerler.
2. **Transferazlar:** Hidrojen hariç fonksiyonel bir grubun iki substrat arasında transferini katalizlerler.
3. **Hidrolazlar:** Ester, eter, glikozit ve peptit bağlarının su molekülünün de katılımıyla hidrolizini gerçekleştirirler.
4. **Liyazlar:** Hidroliz mekanizmasından farklı olarak çift bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir.
5. **İzomerazlar:** Moleküllerde geometrik, optik ve yapısal izomer yapılarının birbirine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir.
6. **Ligazlar (Sentetazlar):** ATP ve GTP gibi yüksek enerjiye sahip olan moleküllerden fosfat atomunun koparılmasıyla açığa çıkan enerjiyi kullanarak moleküller arası bağ kurulmasını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009; Gurung *et al.* 2013).

Bu enzim sınıflarından hidrolazlar (E.C.3.) sınıfında bulunan ester bağlarını parçalayan (E.C.3.1.) karboksilik ester hidrolazlar (E.C.3.1.1.) ve triaçilgliserol hidrolazlar (E.C.3.1.1.3.) lipaz enzimleri olarak tanımlanırlar.

Lipazlar

Lipazlar, karboksil esterazlar da olarak tanımlanan enzim grubudur ve uzun zincirli yağ asitlerinin sentez ve hidrolizini yaparlar (Ochoa *et al.* 2005). Lipazlar α/β hidrolaz süper ailesine mensuptur (Kapoor and Gupta 2012). Bütün lipazlar arasında korunmuş tek bir aminoasit sekans dizisi olan Gly-X-Ser-X-Gly (G-X-S-X-G) pentapeptit yapısını oluşturur. Oluşan bu pentapeptit motifinin etrafında bulunan aminoasit rezidüleri farklı bakteriyel ve mikrobiyal lipazları oluşturup bunların birbirlerine yakınlığını belirler. Bu durum ise farklı lipaz üreticilerindeki mevcut lipaz genlerinin belirlenmesini ve bu genlerin sentezi için gerekli olan uygun primer-prob tasarlanması hususunda kolaylaştırıcı rol üstlenmiştir (da Silva *et al.* 2013; Leather *et al.* 2013; Masomian *et al.* 2016).

Lipazlar hem biyokimyasal hem de moleküler düzeyde çok çeşitli özelliklere sahiptirler. Lipazların doğal substratları kendileri gibi suda çok düşük çözünürlük gösteren uzun zincirli triaçilgliseroller ve yağ asitleridir. Lipazlar triaçilgliseroller ve yağ asitlerini hidrofilik bölgelerinden yakalayıp yüksek etkinlikle kataliz işlemini gerçekleştirirler (Rathi *et al.* 2004; Aulakh and Prakash 2010; Kumar and Kanwar 2012; Tan *et al.* 2018; Javed *et al.* 2018). Lipazların aktivite gösterdiği hidrofilik uç, reaksiyonları katalizleyebilmeleri için gereklidir (Khan *et al.* 2017). Lipazların karakteristik özelliği katalitik aktivitenin gerçekleştirilmesini sağlayan histidin, serin, triptofan aminoasitleri ile karboksilat grubu

taşıyıcılarıdır (Ramakrishnan *et al.* 2016). Taşıyıcıları aminoasit yapıları arasında hidrojen bağı yaparlar (Javed *et al.* 2018).

Lipazlar indüklenabilir enzimlerdir ve yağ asidi ile triaçilgliseroller gibi indükleyici karbon kaynaklarının varlığında aktivite gösterip aynı zamanda üretilirler (Ghosh *et al.* 1996; Lotti *et al.* 1998; Shirazi *et al.* 1998; Rathi *et al.* 2001). Lipaz enziminin üretim proseslerinde sınırlayıcı faktör ise uygun spesifiklikte katalizleme özelliğine sahip olan lipazın yeterli miktarda üretim işlemidir (Deive *et al.* 2012).

Lipaz enzimini dikkat çekici yapan özellikler:

1. Kemoselektif, bölge seçimli (regio-selektif) ve stereo-selektiftirler.
2. Mikroorganizmalar tarafından çok miktarda üretilirler.
3. Pek çok lipazın kristal yapısı çözümlenmiştir ve mühendislik stratejileri ile dizayn edilebilirler.
4. Çoğunluğu reaksiyonları katalizlemek için kofaktör ve ek element gerektirmez (Jeager and Eggert 2002).

Lipazlar;

1) Hidroliz:



2) Esterifikasyon:



3) İnteresterifikasyon (Transesterifikasyon):



4) Asidoliz:



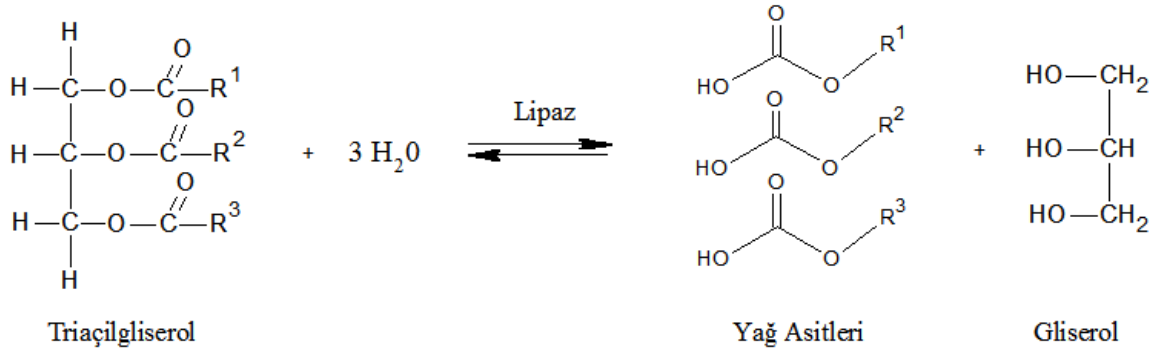
5) Alkoliz:



6) Aminoliz:



olmak üzere 6 temel reaksiyonun katalizini sağlarlar (Rahman *et al.* 2006).



Şekil 1. Lipazların genel hidroliz ve sentez reaksiyonu (Ekinci 2015)

Lipazlar hidroliz reaksiyonlarını katalizlemeleri, esterifikasyon, transesterifikasyon, interesterifikasyon, bölge seçilimli, dönüşümlü ve organik sentezi zor olan bileşikler üretmeleri, ester bağına spesifik oluşları, yan ürün oluşumunu engellemeleri ve kataliz sırasında kofaktöre ihtiyaç duymadan reaksiyonun gerçekleştirilmesini sağlamaları ile organik çözücülere karşı çoğunlukla aktivitelerini korumaları gibi avantajlara sahip oldukları için endüstride de kendilerine geniş bir kullanım alanı bulmuşlardır (Sharma *et al.* 2008; Sangeetha *et al.* 2010).

Lipazlar yağ asidinin zincir uzunluğu, doymunluk derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substratın fiziksel durumuna göre spesifite gösterip aktivite oluştururlar (Abbas 2004).

Lipazlar temelde spesifitelerine göre sınıflandırılırlar:

- 1) Yağ asidi spesifitesine sahip lipazlar
 - 2) Stereo-spesifite ve pozisyonel spesifiteye sahip lipazlar
 - 3) Spesifik olmayan lipazlar
1. Yağ asidi spesifitesine sahip lipazlar: Bu lipazlar uzun zincirli yağ asitlerinde cis pozisyonunda bulunan C-9 ve C-10 arasındaki çift zinciri katalize ederler (Riberio *et al.* 2011; Kapoor and Gupta 2012).
 2. 1-3 spesifik lipazlar: Pozisyonel spesifiteye sahip lipazlardır. Bu lipazlarda trigliseritlerin 1. ve 3. Pozisyonunda bulunan ester bağlarını yıkarlar (Riberio *et al.* 2011; Kapoor and Gupta 2012).
 3. Spesifik olmayan lipazlar: Bu lipazlar trigliseritlerin içinde bulunan serbest yağ asitlerini, gliserolü monogliseritleri ve digliseritleri katalize ederler. Bunlar üzerinde rastgele hareket ederek parçalama işlemini yaparlar. Mono ve di-gliseritler yapısı gereği trigliseritlerden daha hızlı katalize olurlar (Riberio *et al.* 2011; Kapoor and Gupta 2012).

Lipazların protein ve 3 boyutlu yapısı ile ilgili bilgi edinmek amacıyla X-ışını kristalografisi, Ramakhadran diyagramı ve NMR spektroskopisi teknikleri kullanılır. Protein ve 3 boyutlu yapısını belirlemek, lipazların sınıflandırılmasına katkı sağlar (Masomian *et al.* 2016; Castilla *et al.* 2017).

Lipazlar bitkiler ve hayvanların yanısıra bakteri, maya ve küfleri de içeren mikrobiyal flora tarafından da üretilir (Dutta and Ray 2009).

Mikrobiyal Lipazlar

Mikroorganizmalar kolay üreyebilmeleri, istenmeyen ekstra yan ürün oluşturmamaları, ucuz besin kaynakları ile gelişebilmeleri, üretimini ürettikleri enzimlerin stabil olup yüksek aktiviteye sahip olmaları için ve en önemlisi kolay bir şekilde genetik modifikasyona uğratılabilmeleri açısından bitki ve hayvanlara göre biyoaktif molekül sentezinde, enzim üretimi ve sekonder metabolit üretimi yönüyle daha avantajlıdırlar (Jaeger 2002; Saxena *et al.* 2003; Houde *et al.* 2004).

Ayrıca;

1. Mikroorganizmalar hızlı gelişim evresine sahiptirler ve bu yüzden enzim üretimi de hızlıdır.
2. Mikroorganizmaların ürettikleri enzimleri ve metabolitleri elde etmek bitki ve hayvanlara kıyasla daha kolaydır.
3. Mikroorganizmalar genetik olarak daha kolay manipüle edilebilir ve üretimini yaptıkları ürün üzerinde modifikasyon işlemi daha kolay ve hızlı bir şekilde yapılır.
4. Mikroorganizmaların ürettikleri enzimleri hem üretirken hem de elde ederken daha düşük maliyetli yöntemler ve kaynaklar kullanılır.
5. Mikroorganizmalardan elde edilen enzimler daha dayanıklı, yüksek stabiliteye ve yüksek aktiviteye sahip enzimlerdir (Goyal *et al.* 2005).

Mikroorganizmalar biyoaktif molekül sentezinde kimyasal bağların kurulmasını sağlar. *Bacillus*, *Pseudomonas* cinsleri ile aktinomisetler ve mantarlar biyoaktif molekül sentezinde görev alan temel mikroorganizmalardır (Keiser *et al.* 2000; Berdy 2005). Biyoaktif moleküllerden mikrobiyal lipazlar özelliklerine ve substrat spesifitelerine göre ayrılırlar. Mikrobiyal lipazlar hücre dışında, hücre zarına bağlı olarak veya hücre içinde sitoplazmada bulunabilmektedirler (Gupta 1998). Mikrobiyal lipazlardan bakteriyal lipazlar genellikle ekstrasellüler enzimlerdir. Bu yüzden ulaştırılacakları yere kolaylıkla ulaştırılabilmeleri amacıyla bakteriyal membran boyunca lokalize olurlar (Fekkes and Driessen 1999).

Eşsiz katalitik performansları ve çeşitlilikleri mikrobiyal lipazları endüstriyel uygulamalar için gerekli kılar. Ancak değişken izoformlarının varlığı ve ham lipolitik protein miktarı tekrarlanabilir biyokatalitik reaksiyonların olmamasına yol açar. Bunun üstesinden enzimin çeşitli saflaştırma stratejileri ile elde edilmesiyle, spesifite ve stabilitesinin de belirlenebilmesiyle gelinir (Nawani and Kaur 2007). Ekstrasellüler mikrobiyal lipazlar genellikle hücre dışı olduğundan alternatif metot TPP, fraksiyonlama ve konsantrasyon esasına göre kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler (Sharma *et al.* 2012).

Yaygın mikrobiyal lipaz kaynakları *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* bakteri cinsleriyle *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* ve *Candida* mantar cinsleridir. Bu mikroorganizmalarla üretimi yapılan lipaz saflaştırılıp, karakterizasyonu yapılmış olup ve çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. (Gupta *et al.* 2004; Singh and Mukopadhyay 2012).

Mikrobiyal lipazlardan fungal lipaz üretimi ise kullanılan besiyerinin içeriğine karbon ve azot kaynağına göre değişkenlik gösterir (Pandey *et al.* 2016). Fungal lipaz üretenler arasında en yaygın lipaz üreticileri ise filamentli funguslardır. Bunlar saflaştırma ve üretim proseslerinin kolaylığıyla ilişkili olarak önemlidirler (Roy *et al.* 2018). Son yıllarda literatürde belirtilen en iyi lipaz üreticisi maya *Candida utilis*, *Candida rugosa*, *Rhodotorula* suşları, *Yarrowia* suşları ve *Pichia* suşlarıdır (Moftah *et al.* 2012; Divya and Padma 2015; Su *et al.* 2016; lan *et al.* 2016).

Lipaz üreten mikroorganizmalar yağ içeren tohumlar, yağ ile kontamine olmuş topraklar, fabrika atıkları, mandıralar, çürümüş gıdalar ve yağ üretimi yapan fabrikalar gibi çeşitli çevrelerden izole edilmektedirler (Wang *et al.* 2009).

Lipaz üreten mikroorganizmalar direkt ve indirekt metot olmak üzere farklı substratları içeren katı agar ortamı veya sıvı besiyeri olarak iki farklı şekilde geliştirilirler. (Bharathi *et al.* 2018).

Lipaz üretimi genellikle submerged fermantasyon (SMF) sistemi olarak da adlandırılan sıvı lipaz besiyerinde yapılır. Mikroorganizmayı yetiştirme ve özellikle enzimi saflaştırma kolaylığından dolayı sıvı besiyeri tercih edilmektedir (Costa *et al.* 2017). Bu besiyerinde zeytinyağı, hindistancevizi yağı, ayçiçek yağı ve sebze yağları karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Submerged fermantasyon sistemi ile üretilen lipazların çoğunluğu ekstrasellüler olarak üretilir ve genellikle hidrofobik ilişkili saflaştırma stratejisi olan kromatografik yöntemlerle saflaştırılırlar. Katı hal fermantasyonu denilen solid state fermantasyon (SSF) sisteminde ise katı substratlar kullanılır (Rathi *et al.* 2004; Salihu *et al.* 2012; Thaku 2012; Coradi *et al.* 2013; Colla *et al.* 2016).

Mikrobiyal lipazlar yaygın olarak yüksek stabiliteye sahip oluşu ile biyoteknolojik uygulamalarda, deterjan ve tekstil endüstrisinde, yüzey aktif madde üretiminde, yağ arıtım proseslerinde sık sık kullanılırlar (Ochoa *et al.* 2005; Mouad *et al.* 2016; Avhad and Marchetti 2019). Yeni çeşit olan mikrobiyal lipazlar ise ekstrem yapılı enzimlere sahip olan termofilik ve psikrofilik mikroorganizmalardan elde edilmiştir (Demirjian *et al.* 2001).

Tablo 1. Literatürde mevcut olan son yıllarda çalışılmış mikrobiyal lipaz kaynakları (Javed *et al.* 2018; Bharathi and Rajalakshmi 2018).

Mikroorganizma	Ana Kaynağı	Kullanıldığı ve İzole Edildiği Endüstriyel Alan	Çalışma Referansı
<i>Aeromonas caviae</i>	Bakteri	Süt işleme endüstrisi	Velu <i>et al.</i> 2012
<i>Bacillus sp.</i>	Bakteri	Yağ ile kontamine olmuş toprak	Sharma <i>et al.</i> 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	Bakteri	PTCC 1720	Esmaili <i>et al.</i> 2015
<i>Enterococcus durans</i>	Bakteri	Balık atıklarının işlenmesi	Ramamkrishnan <i>et al.</i> 2012
<i>Staphylococcus warneri</i>	Bakteri	Yağ ile kontamine olmuş toprak	Yele and Desai 2015
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bakteri	et işlenmesi	Ji <i>et al.</i> 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Fungi	NCIM	Hosseinpour <i>et al.</i> 2012
<i>Penicillium sp.</i>	Fungi	Soya gıdalarının işlenmesi ve peynir üretimi	Rigo <i>et al.</i> 2010
<i>Rhizopus sp.</i>	Fungi	Yağ ile kontamine olmuş toprak	Thota <i>et al.</i> 2012
<i>Rhizopus oryzae</i>	Fungi	Gıda yağı ile kontamine olmuş toprak	Zhou <i>et al.</i> 2012
<i>Candida sp.</i>	Maya	ATCC 10231	Lan <i>et al.</i> 2011
<i>Cryptococcus sp.</i>	Maya	MTCC 5455	Thirunavayukarasu <i>et al.</i> 2016
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Maya	MTCC	Pohanka <i>et al.</i> 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maya	Zeytin yağı	Ciafardini <i>et al.</i> 2013
<i>Trichosporon asahii</i>	Maya	Petrol ile bulanmış toprak	Kumar and Gupta 2008
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Maya	ATCC 20460	Lopes <i>et al.</i> 2008

Bakteriyal lipazlar

Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin çoğu lipaz üreticisidir. Bakteriyal lipazlar diğer organizmalar ile karşılaştırıldığında yüksek sıcaklık ve geniş pH aralıklarını tolere edebilmeleri açısından daha avantajlıdır (Ramani *et al.* 2010). Bakteriyal lipazlar intrasellüler, ekstrasellüler veya hücre membranına bağlı olarak bulunabilmektedirler (Javed *et al.* 2018).

Endüstriyel süreçlerde hayati rol oynayıp taksonomik olarak birbirine yakın olan bakteriyal suşlar için; birbirlerine yakın olmalarına rağmen birbirlerinden farklı tür lipaz üretimini gerçekleştirebilirler (Lizumi *et al.* 1990; Gupta *et al.* 2004). En yaygın lipaz üreten cins *Bacillus* cinsidir. *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans* türleri ile *Staphylococcus* cinsleri ise bakteriyal lipaz üreticileri içerisinde en aktif lipaz üreticileri olarak uygulamalarda yer alırlar (Daoud *et al.* 2013; Dror *et al.* 2015; Gouwthami *et al.* 2015; Suci *et al.* 2018).

Bakteriyal lipaz üreticilerinden olan *Bacillus* cinsi lipazları özellikle zincir uzunluğuna spesiflik gösterir. Bu yüzden farmasötik endüstrisinde enantiyopür ilaç bileşiklerinin sentezinde sıklıkla kullanılırlar (Guncheva and Zhiryakova 2011).

Tablo 2. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda lipaz üretimi için kullanılan bakteri suşları (Javed *et al.* 2018).

Mikroorganizma	Çalışma Referansı
<i>Acinetobacter</i> XMZ-26	Zheng <i>et al.</i> 2011
<i>Aeribacillus</i> 096201	Lokre and Kadam 2015
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	Masomian <i>et al.</i> 2016
<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> ve <i>Bacillus licheniformis</i>	Ashfag 2015
<i>Bacillus cereus</i>	Akanbi <i>et al.</i> 2010; Ananthi <i>et al.</i> 2014
<i>Bacillus pumilus</i>	Faouzi <i>et al.</i> 2015
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Tripathi <i>et al.</i> 2014
<i>Burkholderia multivorans</i>	Treichel <i>et al.</i> 2010
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Bajaj <i>et al.</i> 2010
<i>Enterobacter</i> Bn12	Farrokh <i>et al.</i> 2014
<i>Enterococcus durans</i>	Rmakrishnan <i>et al.</i> 2012; Salihu and Alam 2015
<i>Enterococcus faecium</i>	Ramakrishnan <i>et al.</i> 2016
<i>Geobacillus</i> EPT9	Zhu <i>et al.</i> 2015
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Dror <i>et al.</i> 2015
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ekinci 2015
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	Kapoor and Gupta 2012
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	Christoper <i>et al.</i> 2015
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	Abol-Fotouh <i>et al.</i> 2016
<i>Lactococcus chungangensis</i>	Konkit <i>et al.</i> 2016
<i>Lanibacter</i> sp.	Castilla <i>et al.</i> 2017
<i>Microbacterium luteolum</i>	Tripathi <i>et al.</i> 2014
<i>Micrococcus luteus</i>	Akbar <i>et al.</i> 2014
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	Bisht <i>et al.</i> 2012
<i>Pseudomonas luteola</i>	Ribeiro <i>et al.</i> 2011
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Zheng <i>et al.</i> 2012
<i>Pseudomonas fluorescence</i>	Kumar <i>et al.</i> 2012
<i>Pseudomonas gessardii</i>	Ramani <i>et al.</i> 2010; Veerapagu <i>et al.</i> 2013
<i>Ralstonia</i>	Yoo <i>et al.</i> 2011
<i>Staphylococcus</i>	Kumar and Singh 2012
<i>Staphylococcus</i> sp.	Daoud <i>et al.</i> 2013
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Mo <i>et al.</i> 2016
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ji <i>et al.</i> 2015

Mikroorganizmalar gelişimleri için gerekli olan sıcaklığa göre 4 ana gruba ayrılırlar. Bunlar psikrofiller, mezofiller, termofiller ve hipertermofillerdir (Adıgüzel 2006; Adıgüzel *et al.* 2009).

Termofilik lipazlar

Termofillerin ürettiği termofilik enzimler analitik ve biyo-katalizleme çalışmalarında geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Bu uygulama alanında kimyasalların, biyo-polimerlerin, materyallerin ve yakıtların yenilenebilir kaynaklardan üretimi endüstriyel biyoteknolojinin temelini oluşturur ve enerji üretimi, ham maddelerin üretimi ve kullanımı, atıkların elimine edilirken çevre dostu proseslerle yapılması termofilik enzimlerin ve lipazların önemini ortaya çıkarmaktadır (Niehaus *et al.* 1999; Turner *et al.* 2007).

Endüstriyel alanda ve çeşitli reaksiyonlarda kullanılan termofilik lipaz ve termofilik enzimlerin avantajları ise şöyledir:

1. Termofilik organizmalardan elde edilen enzimler termostabil özelliğe sahip oldukları için raf ömürleri uzun olan enzimlerdir.
2. Termofilik enzimler organik çözücülere, yüksek ve düşük pH'ya karşı direnç gösterirler; böylelikle denatüre edici ajanlara karşı dayanıklıdırlar.
3. Viskoziteyi ve çözünürlüğü arttırırlar.
4. Patojenik mikroorganizmaların çoğu mezofiliktir ve mezofiller de yüksek sıcaklıklarda gelişemezler böylece enzimatik çalışmalarda mikrobiyal kontaminasyon engellenmiş olur.
5. Termofilik enzimler, kararsız bileşiklerin oluşturbilecekleri biyokimyasal reaksiyonu engeller (Adıgüzel 2006).

Bir enzimi endüstriyel olarak üretmek çok daha zordur ve üretimi yapılan enzimin stabil olması gerekir. Temofilik lipazlar yüksek sıcaklıklarda yüksek termostabilite ve yüksek aktivite gösterir, kimyasal denatürasyona karşı daha dayanıklıdırlar. Bu durum yüksek sıcaklıklarla ilgili olan kimyasal ve endüstriyel uygulamalar için termofilik lipazları ideal araçlar haline getirmektedir (Ochoa *et al.* 2005; Deive *et al.* 2012).

Termofilik lipazların üretim proseslerinde en büyük avantaj; üretim işlemi, yüksek sıcaklıklarda yapıldığı için düşük sıcaklıklarda yaşayan veya mezofilik olarak yaşayan mikroorganizmalar tarafından kontaminasyon riski diğer diğer proseslere göre daha düşüktür. Termofilik lipazların diğer avantajları ise yüksek sıcaklığın viskoziteyi azaltması ve substrat yapısındaki difüzyon katsayısının artması ile reaksiyon hızının ve veriminin artması ve bunların sonucunda reaksiyonun genelinde ısı dengenin sağlanmasıdır. Bu avantajlardan

dolayı termofilik lipazlar protein mühendisliği çalışmaları içinde termostabilite ve termofilitenin belirlenmesi için kullanılırlar (Haki and Rakshit 2003). Aynı zamanda sıcaklık lipaz üretiminde hayati rol oynamaktadır. Optimum sıcaklık mikroorganizma tarafından üretilen enzim ekstraselüler olarak salgılanması için elzemdir (Bharathi *et al.* 2018). Bu da termofilik lipaz üreten organizmaların genelinde enzim ekstraselüler olarak üretimini sağlar. Termofil organizma ve ürün üretiminin dezavantajları ise ölçeklendirme, sıvı ortamın buharlaşması ve malzemelerin ısı etkisi ile zamanla korozyona uğramasıdır (Holst *et al.* 1990).

Lipazların Kullanım Alanları

Lipazlar spesifikiteye sahip olma, yüksek sıcaklıklara ve pH aralıklarına dayanabilme, çok çeşitli selektif oluşları ve toksik olmayan özellikleri ile gıda sektörü gibi endüstriyel alanların en önemli 3 temel enzimlerinden biri haline gelmiştir (Verma and Kavar 2008). Yaygın lipaz kullanımı milyar dolarlar kazandıran bir iştir ve farklı uygulamalarla özellikle deterjan, gıda, eczacılık, peptit sentezi, yağ hidrolizi ve kozmetik sektöründe sıklıkla kullanılır (Jeager and Reetz 1998; Doukyu and Ogino 2010).

Lipazların biyoteknolojik uygulamaları sürekli olarak sadece aktivitelerini belirleyip kullanıma sunan teknikleri gerektirmez; çünkü lipazlar, substrata stereospesifik ve bağlanma yönüyle de spesifiktirler (Beisson *et al.* 2000).

Lipazların Kullanıldığı Güncel ve Temel Biyoteknolojik Uygulamalar

Yeni biyopolimer materyal sentezinde

Biyopolimerler polifenol, polisakkarit, poliesterler gibi çok çeşitli ve komplekstirler. Bu bileşikler biyodegrade olabilmek ve yenilenebilir doğal kaynaklardan üretildiğinden dolayı dikkat çekmiştir. Lipazlar ise polimer materyal sentezinde katalist olarak kullanılır. Lipazların biyopolimer üretimindeki en büyük avantajı yüksek seçicilik niteliğidir (Gross *et al.* 2001).

Biyodizel üretiminde

Toplu taşıma için alternatif enerji kaynağı biyodizel olarak adlandırılır. Biyodizel üretimi lipazların kullanıldığı en önemli biyoteknolojik ve endüstriyel alan olarak kendine yer edinirken biyodizel ise toksik olmayışı, yenilenebilir oluşu ve biyodegradasyona uğrayabilir olması özellikleriyle yağ asidi metil esteri olarak da tanımlanabilen dikkat çekici güncel bir yakıttır (Huang *et al.* 2015) Biyodizel üretimi enzimatik ve kimyasal olmak üzere iki prosesle gerçekleştirilir. Basit saflaştırma stratejileri ve kolay üretilebilir oluşu ile enzimatik üretim prosesleri biyodizel üretiminde çok fazla tercih edilir hale gelmiştir (Dizge *et al.* 2009).

Biyodizel üretimi lipazların günümüzde de biyokatalist olarak kullanıldığı ve bu doğrultuda aktif çalışmaların sürdürüldüğü bir alandır. Biyodizel üretiminin yapıldığı lipazlar diğer endüstriyel lipazlara göre maliyeti yüksek olan enzimlerdir. Bu durum endüstriyel açıdan biyodizel üretiminde büyük bir dezavantajdır; bu durumu avantaja çevirmek için 2 strateji sunulmuştur:

1. *P. fluorescens*'in lipaz enziminin immobilizasyonu
2. *S. cerevisiae*'de *Rhizopus oryzae* lipazının sitoplazmik aşırı ekspresyonudur.

Biyodizelin bitkisel olarak soya, kanola gibi bitkilerden üretimi gerçekleşirken hayvansal üretimi de bulunmaktadır.

Hem biyodizel hem de insektisit, herbisit gibi pestisit ve türevlerinin üretiminde immobilize lipaz formları ağırlıklı olarak kullanılmaktadır (Iso *et al.* 2001; Matsumoto *et al.* 2001).

Lipazların Endüstriyel Uygulamaları

- 1) Yağ asitlerinin ve gliserolün üretimi
- 2) Yağların işlenmesi
- 3) Yağ çeşitlerinin hidrolizi
- 4) Organik çözücüler ile kimyasal sentezi
- 5) Yağ asitlerinin ve triaçilgliserollerin modifikasyonu
- 6) Biyosensör yapımı
- 7) İyi kimyasalların üretiminde; teropötikler, herbisitler, pestisit ve gıdasal tatlandırıcıların üretimi
- 8) Kağıt ve deri sanayinde kimyasal madde sentezi
- 9) Eczacılıkta ilaçların üretimi
- 10) Kozmetik sektöründe ürün eldesi
- 11) Esansiyel yağların işlenmesi ile parfüm ve kokulu maddelerin sentezi
- 12) Deterjan endüstrisinde çıkarılması güç olan yağlı lekelerin çıkarılması ve soğuk-aktif deterjan üretimi, deterjan endüstrileri her yıl 1000 ton lipazı hidroliz reaksiyonu ile lekeleri gidermek için kullanır.
- 13) Gıda endüstrisinde aromaların kazandırılmasında ve krema gibi gıdaların hidroliz edilmesinde, ekmek hacminin artırılıp yumuşaklık kazandırılmasında
- 14) Sabun gibi temizlik maddelerinin üretiminde kullanılır.
- 15) Lipazlar meyve suları, çorbalar, soslar, peynirler ve pişmiş gıdaların raf ömrünün uzatılması ile lezzetlerinin artırılmasında da kullanılmaktadırlar.

(Jaeger and Eggert 2002; Saxena *et al.* 2003; Hasan *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2008; Ray 2012; Parra *et al.* 2015).

Lipazlar tüberküloz gibi bazı hastalıkların teşhis edilmesi amacıyla da kullanılırlar. *Mycobacterium tuberculosis* lipazı yüksek özgüllük ve duyarlılıkla kan serumundaki lipazın sadece tüberküloz teşhisi için değil; akut pankreatit, pankreas hasarı tespiti ve tümör nekroz faktör aktivatörü olması özelliği ile de maling tümörlerin tedavisinde kullanılırlar (Nagarajan 2012).

Lipazlar çevre düzeni ve yönetiminde; atık yağların yok edilmesinde, poliestere atıkların uzaklaştırılmasında, atık su arıtımında ve canlı organizmaların kullanıldığı biyoremediyasyon yönteminde de lipolitik mikroorganizmaların kullanımı ile yaygındır (Pandey *et al.* 1999).

Enzimlerin Saflaştırılması

Enzim saflaştırılmasının amacı; enzimi, sadece diğer komponentlerden ayırmak değildir. Saflaştırma ile enzimin tüm özellikleri, yapısal ve konformasyonel nitelikleri, enzimin aktivitesi, enzimin raf ömrü, kullanım alanları ve çeşitli uygulama alanları belirlenir (Nadeem *et al.* 2009; Nadeem 2015). Endüstriyel hedefler için kullanılacak saflaştırma işlemi hızlı, ucuz, yüksek verimli ve büyük ölçeklerde uygulanabilecek şekilde olmalıdır.

Mikroorganizma kökenli lipazların saflaştırılması ekstrasellüler veya intrasellüler oluşuna bağlıdır (Yang *et al.* 2016). Amonyum sülfat çöktürmesi birbirini takip edecek olan geleneksel saflaştırma metotları veya alternatif metotların erken evrelerindeki kısmi saflaştırma basamağıdır (Saxena *et al.* 2003). Uygulanacak olan geleneksel veya alternatif metot çeşidi ise, lipaz üretimini yapan mikroorganizmaya ve mikroorganizmanın üretimini yaptığı protein miktarına bağlıdır.

Uygulanan saflaştırma metotları ise;

- (1) İyon değişim kromatografisi (anyon değişim / katyon değişim)
- (2) Jel filtrasyon kromatografisi
- (3) Afinite kromatografisi
- (4) Sulu ikili faz sistemi (ATPS)
- (5) Üç fazlı ayırma sistemi (TPP)
- (6) Geri dönüşümlü misel sistemi
- (7) İmmünopurifikasyon (Ig-G antikoru ve antijen özgüllüğü)

(Rathi *et al.* 2001; Zhou *et al.* 2012; Unni *et al.* 2016).

Biyokimyasal karakterizasyon; bir enzimin spesifik özelliklerinin tanımlanması, biyoteknolojik uygulamaları ile endüstriyel üretim ve kullanım proseslerinin belirlenebilmesi yönünden önemlidir (Gupta *et al.* 2004; Singh and Mukopadhyay 2012).

Tezin Amacı

Bu tez çalışması kapsamında; ilk olarak termofilik koşullardan sıcak su kaynaklarından temin edilen su ve çamur örneklerinde gelişim gösteren bakteri suşlarının izolasyonun yapılması; bu suşlar içerisinde yüksek derecede lipaz üretimini yapan suşun belirlenip, bu test suşunun identifikasyon ve moleküler karakterizasyonun yapılması amaçlanmıştır; elde edilen bakteri izolatının lipaz enzimi üretimini gerçekleştirip, enzime geleneksel ve alternatif metotlar olmak üzere iki farklı saflaştırma uygulamasının yapılması; uygulanan geleneksel metotlardan iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ile; bu yöntemlere kıyasla basit aynı zamanda hızlı olup tek adımlık basamakta gerçekleştirilebilen TPP (üçlü faz ayırma) yöntemiyle saflaştırılması hedeflenmiştir. Saflaştırılan enzimin ise biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarının yapıp biyoteknolojik açıdan uygulanabilirliğinin incelenmesi ve enzim saflaştırılması alanında uygulanan yöntemlerin birbirleri ile karşılaştırılması yapılarak avantaj ve dezavantaj olarak değerlendirilmesi; bu doğrultuda elde edilen sonuçların da literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

KURAMSAL TEMELLER

Adigüzel ve ark. (2009) Türkiye'deki değişik sıcak su kaynaklarından termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Çalışmada izolatların, fenotipik özelliklerinin yanı sıra FAME, rep-PCR profili ve 16S rRNA gen dizi analizi gibi genotipik özellikleri de incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda izole edilen bakterilerin, 5 tanesinin *Aeribacillus pallidus* olduğu tespit edilmiştir.

Yasawong et al. (2011) tarafından TD1 bakteri suşu, Tayland'daki Tao Barajı kaplıcalarından izole edilmiştir. TD1 suşunun, Gram pozitif, çubuk hücre şeklinde, aerobik, hareketli ve endospor olduğu belirlenmiş, hücrenin, 2,0-40 µm uzunluğunda ve yaklaşık 0,4 µm çapında olduğu gözlemlenmiştir. Optimum büyümeyi, 55-60°C'de ve pH 7,0-8,0'de gösterdiği tespit edilmiş ve TD1 suşunun, 16S rRNA analizi sonucunda ise, *Aeribacillus pallidus* DSM 3670T'ye % 99 özdeşlik gösterdiği ve pektat liyaz üreticisi olduğu belirlendi.

Taslimi et al. (2013) tarafından *A. pallidus* P26 suşunun izolasyonu, Erzurum, Pasinler Kaplıcasından yapılmış olup, katalaz-persoksidaz enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, CM Sefadex iyon değişim kromatografisi ve Sefaril G-200 jel filtrasyon kromatografisini yöntemleri ile saflaştırmışlardır. Enzimin biyokimyasal karakterizasyonu sonucunda, optimum pH'sını 7,0 sıcaklığını ise, 60°C olarak belirlemişlerdir. Ca^{2+} ve K^{+} varlığında ise, enzimin aktivitesinde %75 artış olduğunu bildirmişlerdir.

Yanmış et al. (2015) yaptıkları çalışmada; izole ettikleri 10 farklı *Aeribacillus pallidus* şuşlarının, FAME, 16S rRNA sekans analizi ve rep-PCR yöntemleri ile karakterizasyonunu yapmışlardır. FAME yönteminin şuşların ayırımında yetersiz kaldığını, buna karşın rep-PCR yönteminin ise termofilik bakterilerin taksonomik karakterizasyon ve identifikasyon amacıyla kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Baltacı et al. (2016) Türkiye'nin farklı bölgelerindeki kaplıcalardan toplanan su ve çamur örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ardından izole edilen mikroorganizmaların, konvensiyonel ve moleküler testler ile identifikasyonu yapılmıştır. Ayrıca izolatların lipaz, amilaz, proteaz ve selüloz gibi biyoteknolojik öneme sahip enzimleri üretme potansiyelleri belirlenmiştir ve tüm izolatların endüstriyel açıdan kıymetli olan enzimlerin en az iki tanesini ürettiklerini bildirmişlerdir.

Görmez ve Gülmüş'ün (2020) yaptıkları çalışmada; Erzurum'da bulunan 3 farklı kaplıcadan alınan su ve çamur örneklerinden 85 adet termofilik bakteri izole etmişlerdir. 16S rRNA analizlerini sonuçlarına göre; 29 farklı izolat elde etmişler ve bu izolatlarında *Bacillus*,

Pseudomonas, *Thermomonas*, *Thauera* ve *Silanimonas* cinslerine ait olduğunu belirtmişlerdir. İzolatların %80'nin amilaz, %91,25' nin lipaz ve %81,25' nin de proteaz enzimlerini üretme potansiyeline sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Tayyab et al. (2011) tarafından Pakistan'ın Kuzey bölgelerinde yer alan Gilgit bölgesinden izole edilen *Geobacillus* sp. SBS-45 suşunun aerobik, çubuk şekilli, gram pozitif, çeşitli şekerleri karbon kaynağı olarak kullanan, 45-75°C'de gelişim gösteren, termofilik nitelikli bir organizma olduğu belirlenmiştir. Bu suşun şaperon kodlayan genleri *Geobacillus kaustophilus* ile %99,4 oranında; tüm genomu ise %99,8 oranında homoloji gösterdiği yapılan BLAST çalışmaları ile belirlenmiştir. Biyokimsiyal karakteri ise *Geobacillus uzenensis* ile benzerdir. Suşun aynı zamanda ekstraselüler lipaz, amilaz ve proteaz ürettiğini belirlemişler. Karakterizasyon sonucunda ise rekombinant lipazın optimum pH: 6,0-12,0, optimum sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir. Elde edilen rekombinant lipazın Ca^{2+} varlığında aktivitesinin arttığı K_m ve V_{max} değerlerinin sırasıyla 3,8 mM ve $2273 \mu\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ olduğu belirlenmiştir. Rekombinant lipaz enziminin pH stabilitesinden dolayı endüstriyel olarak kullanılabileceği araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir.

Deive et al. (2012) yürüttüğü çalışmada Kuzey Batı İspanya Bölgesi olan Galiçya bölgesinde bulunan sıcak su kaynaklarından lipaz enzimi üreten, termofilik olan ve genetik olarak analizini yaptıkları *Bacillus thermoamylovorans* CH6B bakterisinin, *Bacillus thermoamylovorans* ile %100 homoloji gösterdiğini belirlemişler. Bakteriyi pH: 7,0'da ve 55°C sıcaklık koşullarında çalkalamalı inkübatöre kültür şartları ile bıraktıklarında bakterinin lipaz enzimini maksimum seviyede ürettiğini keşfetmişler, araştırmacılar lipaz için substrat olarak orta ve uzun zincirli paranitrofenol esterlerini kullanmışlar ve enzim karakterizasyonu çalışmaları sonunda enzimin termal stabiliteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Stathopoulou et al. (2013) tarafından volkanik alan olan Santorini, Ege Denizi, Yunanistan bölgesinden bakterinin izolasyonu gerçekleştirildi. Lipaz aktivitesinin taranması, hem agar plakalarında hem de sıvı kültürlerde gerçekleştirilip, karbon kaynağı olarak zeytinyağı kullanıldı. Agar plakalarında tanımlanan, lipaz üreten suşların yüzdesi sadece %17 iken, sıvıdaki lipolitik aktivite %74 olarak tespit edilmiştir. Yüksek hücre dışı lipaz aktiviteleri sergileyen dokuz suş seçildi, yüksek miktarda lipaz üretimi ve biyokimyasal karakterizasyonu aşamasına geçildi. Lipaz üreticilerinin çoğu *Geobacillus* türleri ve ilgili cinslerle yüksek filogenetik benzerlik gösterdiği saptandı. Zeytinyağının tüm suşlarda lipaz üretimini sağladığı, ancak bazı suşlar için, maksimum enzim üretiminin, Tween-80, mineral yağ ve gliserol ile elde edildiği bildirildi. Kısmen saflaştırılmış lipazların, 70-80°C ve pH: 8,0-9,0'da optimum aktiviteyi gösterdiği ifade edildi.

Muhammad and Ahmed (2015)'in yaptıkları çalışmada Pakistan'ın Thar Çölü'nden termofilik bakteri suşlarını izole etmişlerdir. Araştırmacılar tarafından, yeni termofilik bakteri suşu olarak belirlenen *Aeribacillus pallidus* SAT4 *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus durans* ve *Pseudomonas aureginosa*'ya karşı önemli ölçüde antibakteriyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler temelli çalışmalar ile bakterinin karakterizasyonunu yapmış ve bakterinin metabolitlerinin, %0-50 oranında amonyum sülfat tuzu ile çöktürmesi yapıp, G-75 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile saflaştırmasını yapmışlardır. Saflaştırdıkları metabolitin SDS-PAGE ile 37 kDa'lık moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmişlerdir. Metaboliti, FTIR ve NMR ile 3 boyutlu yapısını incelemişler.

Bose and Satyanarayana (2016) tarafından *Aeribacillus pallidus* TSHB1 karbonik anhidraz enzimi, ChotiAnhoni Pipariya, Madhya Pradesh (Hindistan) su ve tortu örneklerinden izole edilen halotolerant, orta derecede termofilik ve alkalifilik olan bakteriden üretildi, bakterinin büyümesi ve karbonik anhidraz üretimi yüksek CO₂ konsantrasyonunda (% 5-10) inhibe edildi. Kısmen saflaştırılmış karbonik anhidrazın zimogram analizi, 32 kDa'ya sahip olup, enzimin sırasıyla; 60, 70 ve 80°C'de 40, 15 ve 8 dakikalık inkübasyonu ile pH: 8,0 ve 11,0 arasındaki pH aralığında stabilitesini koruduğu belirlendi.

Ramakrishnan et al. (2016) tarafından yapılan çalışmada optimal şartlar sağlanarak büyütülmüş bir laktik asit bakterisi olan *Enterococcus faecium* (MTCC5695)'dan intraselüler lipazı sulu iki fazlı sistem (ATPS) metodu ile %82,09'luk verim ile 5,99 kat saflaştırılıp enzimin karakterizasyonu yapmışlardır. Alkalın lipaz olan enzimin moleküler ağırlığı 19,2 kDa, optimum sıcaklık ve pH değerlerini ise sırasıyla 40°C ve 10,8 olarak bulmuşlardır.

Mechri et al. (2017) Tunus'un Sfax bölgesindeki jeotermal bir petrol sahasından izole ettikleri *Aeribacillus pallidus* VP3 suşundan ekstraselüler olarak sentezlenen proteazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. 45°C'de büyütülen ve 22. Saat sonunda maksimum aktiviteyi verdiği gözlemlenen SPVP isimli enzimi saflaştırmak için, ilk olarak %40-60 doygunlukta amonyum sülfat tuzu ile çöktürme ve diyaliz yapmışlar; anyon değişim kromatografisi ile 18 kat saflaştırma yaparak, saflaştırılan enzimin, SDS-PAGE analizi ile 29 kDa'luk moleküler ağırlığa sahip olduğu ve *Bacillus* proteazı ile yüksek benzerlik gösterdiği bulmuşlardır. Enzimin aktivitesi için de optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri sırasıyla 60°C ve 10,0 olarak gözlemlenmişler, enzimin yarı ömrünü ise, 70°C' de 8 saat, 80°C' de 4 saat olarak tespit etmişler ve deterjanlara karşı stabil olduğu belirlemişlerdir.

Yıldırım ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada Türkiye'nin Şırnak İlinin Belkısana Kaplıcası'ndan izole ettikleri ve 16S rRNA analizi ile idetifikasyonunu yaptıkları *Aeribacillus pallidus* C10 suşundan ekstraselüler termostabil alkalın proteaz enzimini saflaştırmışlar ve

karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi (%0-90) ve diyaliz sonucunda; DE52 anyon değişim kromatografisiyle ve Probond™ afinite kromatografisi metotları ile sırasıyla; %26,9 verimle; 4,85 kat ve %19,56 verimle; 17,32 kat saflaştırmışlardır. Proteaz enziminin saflığını ve moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla SDS PAGE ve zimogram analizi yapmışlardır. Analiz sonucunda proteaz enziminin moleküler ağırlığını 38,35 kDa olarak tespit etmişlerdir. Enzim karakterizasyonu çalışmaları sonucunda ise, maksimum aktivite için optimum pH: 9,0 ve optimum sıcaklık 60°C olarak araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Enzimin stabil pH: 7,0-10,0 aralığı olduğu ve 20-80°C sıcaklıkları arasında 1 saatlik süre sonunda aktivitesinin %80'den fazlasını korunduğunu bulmuşlardır. Organik çözücülerde stabilitesi %70 iken deterjanlarda %55 olarak belirlenmiştir. %5'lik SDS'in enzim aktivitesini artırdığını, tespitini yapıp K_m ve V_{max} değerlerini ise sırasıyla; 0,197 mg/mL ve 7,29 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir.

Sharma et al. (2018) yaptıkları çalışmada Hindistan'ın Manikaran sıcak su kaynağından termotolerant ekstraselüler alkalifilik lipaz üreten *Bacillus thermoamylovorans* BHK67 bakterisini izole edip identifikasyonunu yapmışlardır. Bakterinin ürettiği lipazı saflaştırmak için, amonyum sülfat ve iyon değişim kromatografisini kullanılarak, %12,1 verimle 15 kat saflaştırma yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmasında, saflaştırılan enzimin maksimum aktiviteyi 55°C'de pH: 7,5'da gösterdiği belirlenmiştir. Enzim kinetiği Lineweaver-Burk ile belirlenmiş, K_m (7,7 mM) ve V_{max} (90,9 U/mL/min) değerlerini hesaplanmıştır.

Javed et al. (2018)'un gerçekleştirdikleri çalışma kapsamında kısa zincirli yağ asitlerinden uzun zincirli yağ asitlerine kadar tüm yağ asitlerinin bakteriyel lipazlar tarafından parçalanması üzerinde durmuşlardır. 19-96 kDa'lık molekül büyüklüğüne sahip olan saflaştırılmış lipazların K_m değeri 0,0064-16,58 mM, K_{cat} = 0,1665- 1,0 x 10⁴ s⁻¹ ve K_{cat}/K_m 26,02- 7377s⁻¹/mM olarak belirlemişlerdir. Optimal sıcaklık ve pH sırasıyla 15-70°C ve 5,0-10,0 aralıkları olarak Javed et al. tarafından belirlenmiştir.

Malekabadi et al. (2018) yürüttükleri çalışmada İran'ın Kerman bölgesinden izolasyonunu yaptıkları *Bacillus licheniformis* KM12 suşunun ve ürettiği lipaz enziminin saflaştırılması ile karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Çalıştıkları lipaz enzimi bakteri tarafından ekstraselüler olarak, tuz toleransı yüksek, soğukta aktif ve organik çözücülerde stabil olma özelliklerine sahiptir. Enzimi saflaştırmak için, öncelikle amonyum sülfat çöktürmesi (%0-80) ve diyaliz yapılmıştır. Ardından Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi ile enzimi, 15,63 kat saflaştırmayı başarmışlardır. Enzim karakterizasyon çalışmaları ile enzimin maksimum aktiviteyi verdiği sıcaklık aralığı olarak 10-35°C'lik değerleri

belirlemişler, enzimin soğuk-aktif olduğunu bulmuşlardır. Enzimin optimum pH'sını 8,0, moleküler ağırlığını 33 kDa olarak bulmuşlar.

Neelam et al. (2018) tarafından Hindistan'ın kurak bölgesinden toplanan kumul örneklerinden bakterilerin taranması yapıp, toplam 8 termofilik bakteri suşunun izolasyonu yapılmıştır. Tüm suşlar, morfolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA gen dizileme analiziyle karakterize edildi. Suşların filogenetik analizi sonucunda; bu suşların, *Bacillus* (5 suş), *Geobacillus* (2 suş) ve *Aeribacillus*'a bağlı olduğu belirlenmiş ve özellikle; *Aeribacillus pallidus* suşunun amilaz, proteaz, lipaz ve asparajinaz gibi bir veya daha fazla hücre dışı enzim üretme kabiliyeti gösterdiği bildirilmiştir.

Silano et al. (2019) tarafından gıda enzimi olan 4- α -glukanotransferaz daha önce genetik olarak modifiye edilmemiş bir *Aeribacillus pallidus* suşu ile üretilmiş olup, *A. pallidus* AE-SAS tarafından üretilen 4- α -glukanotransferazın genotoksisite testleri üzerine çalışılmış ve oral yoldan yutulması üzerine alerjik reaksiyonun göz ardı edilemeyeceğini bildirilmiştir.

Ktata et al. (2020) tarafından izole edilen *Aeribacillus pallidus* VP3'ün ürettiği termoalkalin ve deterjana toleranslı lipaz incelenmiştir. Box-Behnken yöntemi dayanan yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılarak, pH, (C/N) oranı ve inokulum büyüklüğü optimizasyonu yoluyla çalışılan lipaz enziminde, katalitik aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Enzim üretim koşullarının optimizasyonu ile elde edilen aktivitenin (68 U) ve optimizasyondan önceki ilk aktivitenin (24 U) oranı olarak hesaplanan katalitik aktivitede 2,83 kat artış sağladığı hesaplanmış olup, sonuç olarak ise; *Aeribacillus pallidus*'un lipazının, deterjanlara ve yıkama performansına karşı iyi bir stabilite gösterdiği bildirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan su ve çamur örnekleri, Erzurum İli, Ilıca İlçesi Termal Kaplıcası'ndan temin edildi. İzolasyonu ve identifikasyon çalışması sonunda yüksek lipaz aktivitesi gösteren *Aeribacillus pallidus* IO3 izolatı ile çalışmaya devam edildi.

Kullanılan kimyasallar

Tablo 3. Kullanılan kimyasallar ve bileşikler

Kullanılan Kimyasallar ve Bileşikler	Firma ve Şirket Adı
Agaroz	Sigma
Akrilamid	Sigma
Amfisilin	Sigma
Amonyum Sülfat	Sigma
Aseton	Sigma
Bisakrilamid	Sigma
β -Merkaptaenol	Sigma
DNTB	Sigma
DMSO	Sigma
Distile Su	Thermo
DNA Marker	Thermo
dNTP	Thermo
Etidyum Bromür	Sigma
Etil Alkol	Sigma
EDTA	Sigma
Fast Red TR tuzu	Sigma
FeSO ₄	Sigma
Fish Pepton	Sigma
Formaldehit	Sigma
Fosforik Asit	Sigma
Gliserol	Sigma
Hidrolorik Asit	Sigma
Hidrojen peroksit	Sigma
İmmersiyonyağı	Sigma
Isopropyl β -Dthiogalactoside (IPTG)	Sigma
İzoparopanol	Sigma
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Sigma
Lizozim	Sigma
Magnezyum klorür	İnvitrogen
MgSO ₄	Sigma
Malaşit yeşili	Sigma
Na ₂ CO ₃	Sigma
NaOH	Sigma
N,N,N'',N''Tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma
paranitrofenol palmitat (p-NPP),	Sigma

Tablo 3. (devamı)

Promega WizardR Plus Minipreps DNA Purification Systems (Plazmit izolasyon kiti)	Promega
Promega wizardR genomic DNA purification kit (DNA izolasyon kiti)	İnvitrogen
Safranin	Sigma
Sefadex G-100 Kolon Materyali	Sigma
Sodyum asetat	Sigma
Sodyum thio-sülfat	Sigma
Q-Sefaroz Kolon Materyali	Sigma
<i>tert</i> -Bütanol	Ensure
Trizma	Sigma
Tween 80	Sigma
Tween 20	Sigma
Triton X-100	Sigma
5-Bhromo-4-Choloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside (X-Gal),	Sigma
6X Yükleme tamponu	Thermo

Kullanılan Cihazlar

Tablo 4. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Kullanılan Cihaz ve Ekipman Adı	Şirket Adı
Manyetik Karıştırıcı	(Stirrer HS31)
Hassas Terazi	(Geg, Avery)
Buzdolabı	(Siemens)
Steril Kabin	(Telstar AV -100)
Etüv	(Termo Scientific Heraeus Incubator)
Vortex	(WiseMix)
Santrifüj	(Hettich)
Spektrofotometre Cihazı	(Beckman Coulter DU[™]730 Life science UV/Vis spectrophotometer)
Otoklav Cihazı	(Hiclave Hv-50L)
pH Metre	(Metler toledo)
Kar Makinesi	(Scotsman AF-20)
Saf Su Cihazı	(Bamstead Pure Easy)
Peristaltik Pompa	(Ismatec)
PCR cihazı	(Senso Quest)
Elektroforez Cihazı ve Güç Kaynağı	(1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135)
Çalkalamalı İnkübatör	(Midni Dual 14)
Jel Görüntüleme Cihazı	(Fusion)
Deep-Freeze	(Glacier)
Elektroforez Tankı	(Bio-Rad)
Çok Bloklü Isıtıcı	(Lab- Line)
Su Banyosu	(Grant 6G)

Besiyerleri

TSA: (Tryptic Soy Agar)

TSA besiyerinden 3,7 g tartılarak, 100 mL distile su içerisinde çözöldü ve 121°C’de 15 dk otoklavlanarak, steril besiyerleri hazırlandı.

TSB: (Tryptic Soy Broth)

TSB besiyerinden 3 g tartılarak, 100 mL distile su içerisinde çözöldü ve 121°C’de 15 dk otoklavlanarak, steril besiyeri hazırlandı.

LB Agar: (Luria Bertani Agar)

Luria Bertani Agar besiyerinden 35 g alınıp, 1 L distile su içerisinde çözöldü ve 121°C’de 15 dk otoklavlanarak, steril besiyeri hazırlandı.

LB Broth: (Luria Bertani Broth)

Luria Bertani Broth besiyerinden 20 g tartılıp, 1 L distile su içerisinde çözöldü ve 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlanarak, steril besiyeri hazırlandı.

Tribütirin Agar Besiyeri:

1 L distile suya 23 g tribütirin agar ve 10 mL gliserol tribütirat katıldı. Tamamen çözünene kadar ısıtıldı, 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlanarak, steril edildi.

Lipaz Üretim Besiyeri: (1000 mL için)

Tablo 5.’de verilen kimyasallar tartılarak bir beherde magnetik karıştırıcı yardımıyla distile su ile iyice karışımı sağlandı. pH metre ile pH’sı 7,5’a ayarlandı ve toplam hacim 100 mL olacak şekilde erlenlere bölündü. Her 100 mL için, 200 µL Tween 80 ve 3 mL atık yağ kullanıldı. Pamuk ve folyo ile erlenlerin ağızları kapatılarak, 121°C’de 15 dk süre ile otoklavlandı.

Tablo 5. Lipaz üretim besiyeri bileşenleri (1000 mL)

Kimyasallar	Miktar
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
CaCl ₂	0,05 g
FeSO ₄	0,006 g
Fish Peptone	3,0 g

Kullanılan çözeltiler

Bakteri izolasyonu ve identifikasyonu için kullanılan çözeltiler

%0,9'luk NaCl Çözeltisi: 0,9 g NaCl tartılıp, 100 mL distile suda çözüldü ve 121°C'de 15 dk otoklavlandı.

Lügol Solüsyonu: 1 g iyot ve 2 g KCl tartılıp, saf suda çözüldü ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak, hazırlandı.

Safranin Solüsyonu: 1 g safranin %96'lık EtOH'da çözüldü ve üzerine 100 mL distile su eklendi.

Kristal Violet Solüsyonu: 2 g kristal violet %96'lık EtOH'da çözüldü ve üzerine 80 mL distile su eklendi.

Malaşit Yeşili: 5 g malaşit yeşili (oksalat tuzu), 100 mL steril distile su içerisinde çözünmesi sağlandı.

%70'lik EtOH: 70 mL EtOH, 30 mL distile su ile iyice karıştırıldı.

50 mM EDTA Solüsyonu: 1,46 g EDTA tartılıp, bir miktar suda çözüldü ve pH'sı pH metre ile 8'e ayarlandı. Daha sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

1X TAE Tamponu: 100 mL 10X TAE'den alınıp, hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

CaCl₂ Solüsyonu: 1,11 g CaCl₂, 100 mL (100 mM olacak şekilde) distile su içinde çözdürülüp, ağzı pamukla kapatıldı ve otoklavlandı. Kullanılncaya kadar buzdolabında (+4°C'de) muhafaza edildi.

Lipaz Aktivite Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler:

Substrat Çözeltisi: 0,03 g paranitrofenol palmitat hassas terazi ile tartıldı ve 10 mL'lik izo-propanol içinde çözüldü.

Aktivite Tayini İçin Tampon: 0,605 g tris (Trizma) hassas terazi ile tartıldı, üzerine 90 mL distile su eklendi ve pH metre ile pH'sı 8,0'a ayarlandı. Daha sonra son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Na₂CO₃ Çözeltisi: 5,29 g Na₂CO₃, 100 mL distile suda manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldü.

Diyaliz için kullanılan çözeltiler

Tris-HCl Tamponu: 6,05 g tris (Trizma) hassas terazi ile tartıldı ve 1000 mL (1 lt) distile suda çözüldü. pH metre ile pH'sı 8,0'e ayarlandı.

İyon Değişim Kromatografisi ve Jel Filtrasyon Kromatografisi İçin Tris-HCl Tamponu: (50 mM'lık pH: 8,0) Tris- HCl tamponu için 12,1 g tris (Trizma) tartıldı ve 1900 mL'lik distile suda çözüldü. pH metre ile pH'sı 8,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 2 L'ye tamamlandı.

SDS PAGE için kullanılan çözeltiler

1 M'lık Tris-HCl (pH: 8,8): 12,1 g tris tartılarak, 90 mL saf suda çözüldü ve pH metre ile pH'sı 8,8'e HCl ile ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

1 M'lık Tris-HCl (pH: 6,8): 12,1 g tris tartılarak, 90 mL distile suda çözüldü ve pH metre ile pH'sı 6,8'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%30 Akrilamid - %0,8 Bisakrilamid Çözeltisi: 16 g akrilamid ile 0,4 g bisakrilamid, 36,4 mL'lik distile suda çözüldü.

%10'luk Amonyum PER Sülfat Çözeltisi: 0,5 g amonyum PER sülfat tartıldı ve 4,5 mL distile suda çözüldü.

%10'luk SDS: 0,5 g SDS tartılarak 4,5 mL distile suda çözüldü.

Yürütme Tamponu: 3 g Tris ile 14,4 g glisin tartıldı ve bunlar 980 mL distile suda çözüldü. Üzerine %10'luk SDS çözeltisinden 10 mL ilave edildi ve son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Yükleme Boyası: 1 M pH: 6,8 Tris-HCl' den 0,5 mL, % 10' luk SDS'den 1 mL, %100'lük gliserin'den 1 mL ve % 0,1'lik Bromtimol Mavisi'nden 1 mL alındı ve saf su ile son hacim 10 mL'ye tamamlandı. En son 950 µL'lik karışıma 50 µL β-Merkaptaetanol eklendi. Hazırlanan bu yükleme boyası tamponu -20°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

Gümüş boyama için kullanılan çözeltiler

Tespit Çözeltisi: 60 mL distile su, 30 mL %96'lık etanol ve 10 mL asetik asit, 250 mL'lik erlen içinde karıştırılarak hazırlandı.

Redüksiyon Çözeltisi: 80 mL distile su ve 45 mL etanolün üzerine, 4,8 g sodyum asetat eklendi, pH metre ile pH'sı 6,0'a ayarlandı. Daha sonra üzerine 0,15 g sodyum tiyosülfat, 4 mL glutaraldehit ilave edildi ve son hacim 150 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Boyama Çözeltisi: 50 mL distile suyun üzerine 20 µL formaldehit ve 0,1 g gümüş nitrat tartılarak, 100 mL'lik erleninde karıştırıldı ve çözelti hazırlandı. Etrafı alüminyum folyo ile sarıldı.

Yıkama Çözeltisi: 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL distile su ve 120 µL formaldehit karıştırılarak, hazırlandı.

Yıkama Çözeltisi: 2: 1 mL gliserol, 12,5 mL asetik asit ile karıştırıldı ve son hacim 270 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Enzim kinetiğinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler

Optimum pH ve Stabil pH' nın belirlenmesine yönelik kullanılan çözeltiler

Sodyum Asetat Tamponu (50 mL pH: 5,0): 0,2 g sodyum asetat, 48 mL distile suda çözülüp, pH metre ile pH'sı 5,0'a ayarlandı ve son hacim 50 mL'ye distile su tamamlandı.

Sodyum Asetat Tamponu (50 mL pH: 6,0): 0,2 g sodyum asetat, 48 mL distile su ile çözüldü ve pH metre ile pH'sı 6,0'ya ayarlandı. Daha sonra son hacim, distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

KH₂PO₄ Tamponu (50 mL pH: 6,0): 0,34 g KH₂PO₄ tartılıp, 48 mL saf suda çözüldü, pH metre ile pH'sı 6,0'a ayarlandı ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

KH₂PO₄ Tamponu (50 mL pH: 7,0): 0,34 g KH₂PO₄ tartılıp, 48 mL saf suda çözüldü, pH'sı 7,0'a ayarlandı ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

KH₂PO₄ Tamponu (50 mL pH: 8,0): 0,34 g KH₂PO₄ tartılıp, 48 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 8,0'a ayarlanarak hazırlandı. Daha sonra son hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Tris - HCl Tamponu (50 mL pH: 8,0): 0,3 g tris (Trizma) tartılıp, 48 mL saf suda çözüldü, pH'sı 8,0'a HCl ile ayarlandı. Son hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Tris - HCl Tamponu (50 mL pH: 9,0): 0,3 g tris (Trizma) tartılarak 48 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 9,0'a ayarlandı ve son hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Glisin - NaOH Tamponu (50 mL pH: 9,0): 0,188 g glisin tartılarak, 48 mL distile suda çözüldü, pH değeri 9,0'a ayarlandı, son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin - NaOH Tamponu (50 mL pH: 10,0): 0,188 g glisin tartılarak, 48 mL distile suda çözüldü, pH'sı 10,0'a ayarlandı. Daha sonra son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin - NaOH Tamponu (50 mL pH: 11,0): 0,188 g glisin tartılarak, 48 mL saf suda çözüldü, pH değeri 11,0'e ayarlandı ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin - NaOH Tamponu (50 mL pH: 12): 0,188 g glisin tartılarak, 48 mL saf suda çözüldü, pH metre ile pH değeri 12,0'a ayarlandı. Daha sonra son hacim, distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Protein analizi için kullanılan bradford çözeltisi

0,1 g Commasie Brilliant Blue G-250 tartılarak, balon joje içinde 50 mL, %95'lik EtOH içerisinde çözüldü. Daha sonra bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit eklendi ve çözeltinin son hacmi 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Çözelti karanlık ortamda hazırlanıp oda koşullarında karanlık ortamda muhafaza edildi.

Yöntem

Termofilik bakterilerin izolasyonu

Erzurum, Ilıca termal tesisinden alınan su ve çamur örneklerinden bir miktar alınarak, erlenlere bırakıldı ve üzerine uygun miktarda TSB (Trypton Soy Broth) besiyeri konularak, 55°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda gelişen bakterilerin seri dilüsyonları (10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar) hazırlandı ve bunlardan 100 µL alınarak, TSA (Trypton Soy Broth) besiyerinde yayma ekim yapıldı ve 24-48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petrilere gelişen farklı koloni morfolojisine sahip bakteriler seçilerek, 3 faz çizgi ekim yöntemi ile saf kültürleri hazırlandı. Hazırlanan saf kültürlerden steril öze ile koloniler alınarak, TSB sıvı besiyerine inokülasyon işlemi gerçekleştirildi ve 55°C'de 24-48 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda test suşlarının bulunduğu tüplerden stok kültürleri hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi (Adıgüzel 2006).

İzole edilen bakterilerden lipaz enzimi üreten izolatların, tribütirin agar besiyerinde belirlenmesi

Test izolatları (O1, O2, IO3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11) -86°C'den alınarak TSA besiyerine 3 faz çizgi yöntemi ile aktarıldı ve 55°C'de 1 gece boyunca inkübasyona bırakıldı. TSA besiyerinde büyüyen saf koloniler alınarak, 5'er mL TSB besiyeri bulunan tüplere aktarıldı ve çalkalamalı inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Daha sonra hazırlanan Tribütirin Agar Besiyeri petrilere dökülüp donduktan sonra besiyerleri 4 bölüme ayrıldı. TSB besiyerinde büyüyen bakteriyel sıvı kültürlerden 20 µL alınarak disklerle emdirilip, petrilere bırakıldı ve 2-3 gün süre ile 55°C'de inkübe edildi. Süre sonunda tribütirin agar besiyerinde zon oluşup oluşmadığı gözlemlendi (Ertuğrul ve ark. 2007).

Petrilerde oluşan şeffaf zonlar incelendiğinde, lipaz aktivitesi en yüksek olan bakterinin IO3 suşu olduğu tespit edildi. Sonraki çalışmalara bu izolat üzerinden devam edildi.

Seçilen İzolatın Konvensiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Morfolojik özelliklerin belirlenmesi

İzolatın morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla stok kültürden TSA besiyerine bakterinin 3 faz çizgi ekim yöntemiyle aktarım işlemi gerçekleştirildi ve 55°C’de 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda test izolatının koloni morfolojisi binoküler mikroskop, hücre morfolojisi ise basit boyama yapılmış preparatın ışık mikroskobu altında gözlemlemesi ile tespit edildi (Albayrak 2018).

Gram boyama

Genç bakteri kültüründen steril öze ile örnek alınarak, lam üzerinde smear preparat hazırlandı ve kristal violet ile 1 dk boyunca boyandı, fazla boya preparat üzerinden saf su ile uzaklaştırıldı. Daha sonra üzerine lügol eklenerek, 1 dk boyunca inkübe edildi ve hemen ardından preparat %96’lık etil alkol ile yıkandı. Yıkama sonrası Gram(+) bakteriler peptidoglikan tabakaları kalın olduğu için mor renkli olarak boyanırken, Gram(-) bakterilerin dış membran yapıları alkolden dolayı bozulup, ince peptidoglikan duvar yapıları boyayı tutamadığı için renksizleşti. Saf su ile yıkanan preparat safranin ile 20 sn süreyle boyandı. Boyama sonunda saf su ile yıkanan preparatın kuruması beklenip, mikroskop altında gram özellikleri incelendi (Arslan 2017).

Endospor boyama

Endospor varlığını belirlemek amacıyla test suşu, stok kültürden TSA besiyerine aktarıldı ve 24-48 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kültür petrisi inkübatörden çıkarılarak, çeşitli stres koşullarında bekletildi. Stres koşullarında bekletilen saf kültürden smear hazırlandı ve kaynatılmış su banyosu üzerine yerleştirildi. Yerleştirilen preparatın üzeri, tamamen malaşit yeşiliyle kaplandı ve üzerine kurutma kağıdı konularak, 5-7 dk boyunca malaşit yeşili ile preparatın sürekli ıslak kalması sağlandı. 5-7 dk’lık bekleme süresinin sonunda preparatın üzerindeki kurutma kağıdı kaldırılıp, su ile yıkandı ve fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı. Preparatın üzerine safranin döküldü ve 20-30 sn süre boyunca safranin ile muamele edildi. Gerçekleştirilen bu karşıt boya uygulamasından sonra, preparat tekrar saf su ile yıkanıp kurutuldu ve immersiyon yağı kullanılarak %100’lük objektifte endospor oluşturup oluşturmadığı belirlendi (Arslan 2017).

Hareketlilik testi

İzolasyonu yapılan bakteri kültüründen TSB ve % 0,6 g agar içeren deney tüpüne iğne öze yardımıyla inokülasyon işlemi gerçekleştirildi ve 24-48 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpte oluşan ekim çizgisindeki bakteri gelişim durumu incelenerek pozitif ya da negatif olarak değerlendirme yapıldı (Baltacı 2015).

İzolatın Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatın gelişim gösterdiği tuz konsantrasyonunun belirlenmesi

İzolasyonu yapılan ve seçilen bakteri suşunun (IO3) gelişebildiği tuz aralığının belirlenebilmesi için farklı tuz konsantrasyonlarına (%2, %4, %6, %8, %10 ve %12'lik) sahip olan TSB besiyerlerine test suşunun inokülasyonu yapıldı ve tüpler çalkalamalı inkübatörde 24-48 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda termofilik bakterinin üreyebildiği minimum ve maksimum tuz konsantrasyon değerleri spektrofotometrik (OD_{600}) olarak belirlendi.

İzolasyonu yapılan bakterinin gelişim gösterebildiği sıcaklık aralığının belirlenmesi

İzole edilen bakteri suşunun gelişebildiği maksimum, minimum ve optimum sıcaklık değerlerinin tespit edilmesi amacıyla termofilik bakteri TSB sıvı besiyerine inoküle edildi ve farklı sıcaklık değerlerinde (15°C, 25°C, 35°C, 45°C, 55°C ve 65°C) 24-48 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda izolatın gelişebildiği sıcaklık aralığı, spektrofotometrik ölçümler (OD_{600}) ile tespit edildi (Baltacı 2015).

İzolasyonu yapılan bakterinin gelişim gösterdiği pH aralığının belirlenmesi

İzolasyonu yapılan bakteri suşunun (IO3) gelişebildiği maksimum, minimum ve optimum pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla farklı pH değerlerine (3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0) sahip olan TSB sıvı besiyerlerine bakteri inoküle edildi ve erlenler 24-48 saat süre boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi biten kültürler inkübatörden çıkarılarak, 600 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede (OD_{600}) ölçüm yapıldı ve mikroorganizmanın gelişebildiği pH aralıkları belirlendi (Arslan 2017).

İzolasyonu Yapılan Bakterinin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Katalaz testi

Katalaz enzimi ETS (Elektron Taşıma Zinciri)'nin sonunda açığa çıkan hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayarak, H_2O ve O_2 gazına dönüştürür. Bu esnada açığa çıkan O_2 gazı, kabarcık oluşturur. Bu analiz işlemi için canlandırılan test suşundan bir öze dolusu alınarak,

üzerinde %5'lik hidrojen peroksit damlası bulunan lam üzerine bırakılır ve homojenize edilir. Bu işlem sonunda hava kabarcığı oluşturan bakteri, katalaz enzimi açısından pozitif, oluşturmayan ise negatif olarak değerlendirilir. (Arslan 2017).

Oksidaz testi

Bu test ile bakterinin elektron transferinde önemli rol oynayan sitokrom C proteinini taşıyıp taşımadığı tespit edilir. Sitokrom C proteini canlı organizmalarda solunum olayında görev alır. Analiz için %1'lik tetra metil-p-fenilendiamin di-hidroklorid içeren hazır kit kullanıldı. Bu amaçla kit içerisinde bulunan disklere bir damla su damlatıldı ve üzerine bir miktar bakteri bırakıldı. Oksidaz pozitif bakteriler mavi-mor renk oluştururken, negatiflerde ise renk oluşumu gözlemlenmedi (Sarı 2016).

Test Suşunun Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu

Genomik DNA izolasyonu

IO3 izolatu TSA besiyerine aktarıldı ve 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Kültür petrisinden tek bir koloni alınıp, içerisinde TSB sıvı besiyeri bulunan falkon tüplere inoküle edildi. Daha sonra tüpler 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı, süre sonunda bakteriye ait genomik DNA Promega WizardR genomic DNA purification kit (A2360) protokolüne uygun olarak izole edildi (Arslan 2017).

16S rRNA PCR analizi

Evrimsel yönden korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesi bakteri sistematigi açısından büyük önem arz eder. Bu amaçla bu gen bölgesi Universal 16S rRNA primerleri kullanılarak *in vitro* koşullar altında çoğaltıldı.

PCR Reaksiyonu:

Test izolatından elde edilen DNA örneğinin 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmak için 30 µL'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Ayrıca yöntemde DNA örneği içermeyen bir tüpde, negatif kontrol olarak amplifiye edildi. Tüpler için, **Tablo 6.**'da verilen reaktifler belirtilen miktarda hazırlandı (Adıgüzel 2006).

Tablo 6. PCR tüpleri reaktif içeriği

Reaktif	Konsantrasyon	Miktar
PCR Buffer	10X	3 µL
dNTP	25 mM	0,6 µL
MgCl ₂	25 mM	1,8 µL
27F	5 pmol	3 µL
1492R	5 pmol	3 µL
DMSO	%99	1,2 µL
ddH ₂ O	–	14,4 µL
Kalıp DNA	100 ng	3 µL

Hazırlanan PCR tüpleri termal döngü cihazına yerleştirilerek istenilen DNA bölgesi çoğaltıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

Tablo 7. PCR programı ve programı ve sıcaklık döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	3	1
Denatürasyon	94	1	35
Bağlanma	57,5	1	35
Uzama	72	1,30	35
Son Uzama	72	5	1
Saklama	4	∞	

16S rRNA PCR ürünlerinin jel elektroforezi

Jel elektroforezi için öncelikle 0,8 g agaroz üzerine 80 mL 1X TAE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilip, karışım mikrodalga fırında çözününceye kadar kaynatıldı. Kaynatılan jel 50°C sıcaklığa ininceye kadar soğutuldu ve 4 µg/mL miktarda etidyum bromür ilave edilerek, içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 30 dk donması beklendi ve donan jelden taraklar dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Ardından küvet, içerisinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. Jeldeki ilk kuyucuğa, 10 kb'lık DNA markırından 2,5 µL ve kuyucuklara ise, her bir örnek için 3 µL 6X yükleme tamponu ve 6 µL PCR ürünü karışımından yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 120 volta ayarlanarak, örnekler 110 dk boyunca yürütüldü. Jel üzerinde bulunan ve etidyum bromür ile boyanan DNA bantları jel görüntüleme cihazı ile görüntülenip bilgisayar ortamında (Quantum Vilber Lournat Gel Documentation System) analiz edildi.

Klonlama

Kompetent hücrenin hazırlanması

- ✓ *Escherichia coli* JM-101 suşu ve gelişen bu kültürden tek bir koloni alınarak, içerisinde LB besiyeri bulunan erlene aktarıldı. 37°C’de 1 gece çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Bu kültürden 300 µL alınarak, 2700 µL steril distile su ile seyreltildi ve 600 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılarak, OD değeri belirlendi.
- ✓ $30 \text{ (hazırlanacak mL cinsinden miktar)} \times 0.1 \text{ (sabit değer)} / \text{Çıkan değer} \times 10$ (seyreltme oranı) formülünden elde edilen değer, bize kültürden alınması gereken miktarı verir.
- ✓ 30 mL LB Broth üzerine, bu kültürden belirlenen miktar kadar ilave edilerek, 37°C’de 0,44-0,55 değerlerine ulaşıncaya kadar inkübe edildi.
- ✓ Hedeflenen değere ulaşıncaya kültür çalkalamalı inkübatörden alınarak, 4400 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- ✓ Elde edilen çökeltinin üzerine, buzdolabında bekletilen 100 mM CaCl₂’den 10 mL ilave edildi ve 30-45 dakika boyunca buzda bekletildi.
- ✓ Süre sonunda 4400 rpm’e ayarlanmış olan santrifüjde (4°C’de) 10 dk süreyle çöktürme işlemi uygulandı ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine buzdolabında bekletilen 100 mM CaCl₂’den 2 mL eklendi ve bir gece boyunca buzdolabında +4°C bekletildi (Arslan 2017).

Ligasyon işlemi

Ligasyon işlemi için kullanılan kimyasallar ve reaktifler:

- 5 µL 2X Ligasyon Bufferı
- 3 µL PCR ürünü
- 1 µL vektör
- 1 µL T4 DNA ligaz

Kimyasallar 0,2 mL’lik tüplerde bir araya getirildi ve elde edilen karışım, 16°C’de 15 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler kullanılıncaya kadar +4°C’de muhafaza edildi.

Transformasyon işlemi

- ✓ Her bir ependorf tüpüne buzdolabında bekletilen kompetent hale gelmiş hücrelerden 200 µL konuldu ve üzerine 2,5 µL ligasyon ürünü eklenerek, 30 dk boyunca buzda bekletildi.
- ✓ 30 dk'lık süre sonunda buzda bekletilen tüpler, 42°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 2 dk süreyle ısı şokuna tabi tutuldu.
- ✓ Her bir tüpdeki solüsyonun üzerine, 200 µL LB eklendi ve 37°C'de 100 dk bekletildi.
- ✓ Buzdolabında saklanan 40 µL X-Gal ve 40 µL IPTG çıkarılarak, oda ısısına gelmesi sağlandı ve ardından her ikisi de amfisilinli katı besiyerine yayıldı.
- ✓ Yayma işleminden sonra, petriyer yüzeylerinin kuruması için bekletildi ve Ligasyon ürünü+Kompetent hücre karışımından 150 µL alınarak, petriyerin tam ortasına konuldu ve drigalski özesi ile karışım iyice yayıldı. İşlem sonunda petriyer 37°C'de yaklaşık 15 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

Koloni seçimi ve sıvı kültüre aktarım

15 saatlik süre sonunda petriyer inkübatörden çıkarıldı ve +4°C'de bir gece bekletildi. Petriyerde oluşan mavi ve beyaz kolonilerden beyaz koloniler seçilerek, içerisinde 3 mL Amfisilinli LB Broth bulunan tüplere aktarıldı ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Koloni PCR

- ✓ Amfisilinli LB Broth'da gelişmesi sağlanan bakteriyal kültürden 4 µL alınarak içerisinde 16 µL steril saf su bulunan tüplere aktarıldı ve 10 dk boyunca kaynayan su banyosunda bekletildi. Süre sonunda tüpler, 2 dk süre ile buz üzerinde ısı şokuna maruz bırakıldı.
- ✓ Tüpler 5 dk süre ile 12000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatant yeni bir tüpe aktararak, PCR işlemine geçildi.

PCR işlemi için kullanılan kimyasallar

- 16,1 µL dH₂O
- 3 µL tampon (MgCl₂'li)
- 0,6 µL dNTP mix
- 1,8 µL MgCl₂ (25 mM)
- 2'şer µL 5 µM primer [T7 (5'-AATACGACTCACTATAG-3') ve SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')]
- 0,3 µL Taq DNA Polimeraz

- 1,2 µL DMSO
- 3 µL Süpernatant

Tablo 8. Koloni PCR döngüsü

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	10 dk	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Bağlanma	50°C	30 sn	35
Uzama	72°C	2 dk	35
Son Uzama	72°C	10 dk	1
Saklanma Evresi	4°C	∞	

- ✓ %1'lik agaroz jel hazırlanır ve ona uygun miktarda EtBr ilave edilip, donması sağlandı. Daha sonra içerisinde istenen geni taşıyan (pozitif) ve taşımayan (negatif) kontrol yüklenerek, 110 voltta 1 saat süre boyunca yürütüldü.
- ✓ İstenen geni taşıyan koloniler, PCR görüntülerine göre plazmit izolasyonu için amfisilinli LB Broth besiyerine aktarıldı.

Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu Promega markasına (A1330) ait izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Arslan 2017).

Plazmitlerin kontrol edilmesi

Koloni PCR ile bu basamak kısmen aşılmış olsa da, istenilen bölgenin klonlanıp klonlanmadığını kontrol etmek amacıyla, örnekler, *EcoRI* ile kesildi (Baltacı 2015).

Plazmitlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve ayarlanması

- ✓ 998 µL saf su üzerine 2 µL plazmit konularak, OD₂₆₀'da spektrofotometrik ölçüm yapıldı.
- ✓ $A_{260} \times 50$ (sabit) $\times 500$ (dilüsyon oranı) formülü ile plazmitin konsantrasyonu, 100-200 ng/mL olacak şekilde ayarlandı.
- ✓ Uygun konsantrasyondaki tüplerden 30-50 µL alınarak, sekans analizi için plazmitler MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

DNA dizi analizi

Firmanın sayfasından indirilerek elde edilen sekans sonuçları BioEdit programı ile analiz edildi ve FASTA formatına çevirildi. İlk olarak primerler bulundu ve primerlerin

önünde ve arkasında kalan vektöre ait kısımlar çıkarıldı. Sonra diziler birleştirilerek anlamlı hale getirildi (Albayrak 2018).

Sonuçların Değerlendirilmesi

Anlamlı hale getirilen sekans verilerinin Blast analizleri http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome ve <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify> internet adresleri kullanılarak gerçekleştirildi ve % benzerlik oranı belirlendi. Elde edilen veriler GenBank'a girilerek test izolatu için GenBank numarası alındı (Albayrak 2018).

Enzim Saflaştırılması ve Karakterizasyon Çalışmaları

Lipaz enzimini üreten IO3 suşundan ön kültür hazırlanması

Test izolatının -86°C'de bulunan stok kültürden TSA besiyerine 3 faz çizgi ekimi yapılarak 55°C'de etüvde 24-48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı ve IO3 suşu canlandırıldı. Süre sonunda TSA besiyerinde gelişen saf kolonilerden 1 öze dolusu alınarak 100 mL'lik otoklavlanmış steril TSB sıvı besiyerine inokülasyonu yapıldı ve 1 gece boyunca 55°C'de çalkalamalı inkübatöre inkübasyona bırakıldı.

Test izolatının lipaz besiyerinde üretilmesi

Ön kültürden 1 mL alınarak, **Tablo 5**'te belirtilen kimyasallar ile hazırlanan lipaz besiyerine, inokülasyon yapıp, çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Ardından, besiyerinden 24, 48 ve 72. saatlerde örnek alınıp, lipaz aktivitesi ölçümü yapıldı (Hatzinikolau *et al.* 1996; Koç 2013; Malekabadı *et al.* 2018).

Enzim homojenatının hazırlanması

Ekstrasellüler olarak üretimi yapılan lipaz enzimini elde etmek için enzimin en yüksek aktiviteyi verdiği 48. saatte kültür, 15 mL'lik falkon tüplere alınarak 6000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüj ile hücrelerin çökmesi sağlandıktan sonra süpernatant kısmı alınarak homojenat elde edildi (Hiol *et al.* 2000).

Enzim aktivite tayini metodu

Çalışma kapsamında lipaz enzimi aktivitesi paranitrofenol palmitat (p-NPP) substratı kullanılarak, spektrofotometrik olarak belirlendi. Enzimin, üzerine 1 mL Tris-HCl (pH:8.0, 50 mM) tamponu ve 1 mL substrat paranitrofenol palmitat (p-NPP) çözeltisi sırasıyla konuldu. 55°C'de 10-15 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüp içerisindeki reaksiyonu durdurmak amacıyla, 2 mL Na₂CO₃ çözeltisi eklendi ve 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Numunelerden

2 mL alınarak, santrifüjlendi (10000 rpm, 5 dk) ve spektrofotometre cihazı ile 410 nm’de verdiği absorbansa göre enzim aktivitesi tayin edildi (Winkler and Stuckmann 1979; Hung *et al.* 2003; Chiou and Wu 2004; Thongekkaew and Boonchird 2007).

Lipaz enzimi aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$EU/ mL = [(\Delta A / \Delta t)] \times [V_t / (\epsilon \cdot d \times V_0)] \times (10^3)$$

EU/ mL = Enzim aktivitesi ($\mu\text{mol dk}^{-1} \text{mL}^{-1}$)

ΔA = Absorbans değışikliğı (410 nm)

Δt = İnkübasyon Süresi

V_t = Toplam hacim (mL)

ϵ = p-NPP substratının molar ekstinksiyon katsayısı ($13,290 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d = Küvetteki ışık yolu (cm)

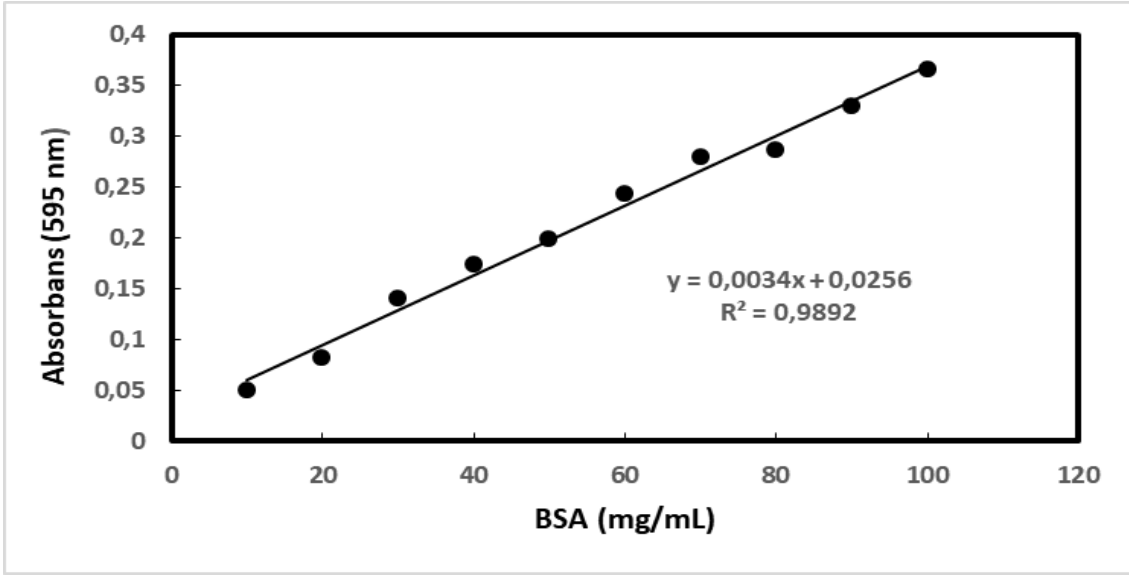
V_0 = Enzim hacmi (mL)

Kantitatif protein tayini

Lipaz enziminin saflaştırılması ile ilgili tüm basamaklarda protein miktar tayini Bradford yöntemine göre yapıldı (Bradford 1976). Yöntemde boya olarak negatif olan ve protein yapısındaki pozitif yüklere bağlanarak çalışan, Commasie Brilliant Blue G-250 Boyası proteinlerle kompleks oluşturmaya dayanarak kullanıldı. Yöntemde oluşan kompleks, 595 nm’de maksimum absorbansı vermektedir. Bu yöntemde proteine boyanın bağlanması çok hızlı gerçekleşen bir olaydır ve kompleks oluşturur. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süreli olarak kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. Çalışmalar kapsamında numune çalışmaları için homojenat; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değışim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve TPP saflaştırma yöntemlerinden elde edilen saflaştırılması yapılmış enzim çözeltilerine ayrı ayrı kantitatif Bradford protein tayini metodu uygulandı.

Protein miktarını tayin etmek amacıyla standart grafiğın hazırlanması;

1:1 oranında protein içeren BSA çözeltisi saf su ile hazırlandı. Bu çözeltilerden 10 ayrı tüpe sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μL alınarak konuldu ve son hacimleri 100 μL ’ye saf su ile tamamlandı. Bütün tüplere 4900 μL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi konuldu. 10 dk süre boyunca beklenip 100 μL saf su ve 4900 μL Coomassie Brilliant Blue G-250 ile hazırlanan köre karşı spektrofotometre cihazında 595 nm’de absorbans değeri ölçülerek BSA standart grafiğı çizildi (Alçıçek 2017).



Şekil 2. Protein tayini için kullanılan standart BSA grafiği

Protein miktarı bilinmeyen enzim örnekleri için; aynı şekilde 0,1 mL enzim çözeltisi üzerine 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 boya çözeltisi eklendi. 10 dk inkübasyondan sonra 595 nm’de absorbans değeri ölçüldü ve oluşturulan standart grafik kullanılarak protein miktarı belirlendi.

Kalitatif protein tayini metodu

Yöntem 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, fenil alanin ve tirozin amino asitlerinin maksimum absorbansı vermesi esasına dayanmaktadır. Protein varlığını belirleyen hızlı bir yöntemdir. Örnekler kuvarz küvetlere 1 mL miktarda alındı ve 280 nm’de spektrofotometre cihazında köre (50 mM, pH: 8,0 Tris-HCl tamponu) karşı okutulularak protein varlığı belirlendi (Chen and Segel 1968; Lee *et al.*1999).

***Aeribacillus pallidus* IO3’ten lipaz enziminin saflaştırılması**

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Homojenatta, %0-20, %20-40, %40-60, %60-80, %80-90 aralıklarında ayrı ayrı amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Yapılan amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında, elde edilen çökeltide ve süpernatantta aktivite ölçümü yapılarak enzimin en aktif olduğu aralık belirlendi. Enzim aktivitesinin çökeltide en fazla olduğu aralık, enzimin amonyum sülfat doygunluk aralığı olarak belirlendi. Bundan sonra çöktürme işlemi belirlenen aralıkta yapıldı. Bütün işlemler +4°C’de buzun üzerinde gerçekleştirildi. Her defasında homojenatlar 5000 rpm’de 20 dakika santrifüjlendi. Daha sonra süpernatantlar ayrı behere alındı, çökeltiler çözölebilecek kadar Tris-HCl pH’sı 8,0 olan tampon içerisinde çözüldü. Daha sonra hem süpernatantta hem de çökeltide ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi, 50 mM Tris-HCl pH'sı 8,0 olan tamponda 2-3 saat süreyle +4°C'de, buz içerisinde magnetik karıştırıcı üzerinde düşük hızda diyaliz edildi, daha sonra protein ve aktivite tayini yapıldı (Ravidran *et al.* 2011; Yıldırım ve ark. 2017; Alçiçek 2017).

Amonyum sülfat çöktürmesinde kullanılan amonyum sülfat tuzunun miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$g (NH_4)_2SO_4 = 1,77 \times V \times (S_2 - S_1) / 3,54 - S_2$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in Kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in Kesri olarak hedeflenen amonyum sülfat doygunluğu

Q-Sefaroz iyon değişim kromatografisi

Kullanılan anyon değişim kromatografisi kolon dolgu materyali olan Q-Sefaroz hazır olarak satın alındı. Kolon dolgu materyali ilk olarak saf su ile daha sonra da Tris-HCl tamponu (pH: 8,0, 50 mM) ile yıkandı ve içerisinde dengeleme tamponu (pH: 8,0, 50 mM Tris-HCl) olan kolona dökülerek yerçekimine karşı jelin yatak hacmi sabit oluncaya kadar kolon paketlenildi. Ardından akış hızı 3 mL/saat olacak şekilde peristaltik pompa yardımıyla kolonun dengelenme tamponu ile dengelenmesi sağlandı. Dengelenen ve Tris-HCl tamponunun (pH: 8,0, 50 mM) uzaklaştırıldığı kolona diyaliz sonunda elde edilen enzim tatbik edildi. Yıkama işlemi (pH: 8,0, 50 mM Tris-HCl) tamamlandıktan elüsyon işlemi için farklı tuz gradientlerinde (50-100-150-200-300-400-500-600-800-1000 mM NaCl) hazırlanmış Tris-HCl tamponu (pH: 8,0, 50 mM) kullanılarak kolon akış hızı 12 mL/saate ayarlandı ve elüatlar 3 mL'lik tüplere toplandı. Her bir elüat için 280 nm'de absorbans ölçümü yapılarak absorbans gösteren tüm tüplerde lipaz aktivite ve kantitatif protein tayini yapıldı (Malekabadı *et al.* 2018).

Sefadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Kolon materyali olan Sefadex G-100 jeli 3 g tartılıp 200 mL saf suda çözülerek oda sıcaklığında 1 gece boyunca jel bekletildi. Jelin vakum ile havası alınıp Tris-HCl tamponu (pH: 8,0, 50 mM) ile dolu olan kolona paketlenildi. Kolonu dengellemek için Tris-HCl tamponu (pH: 8,0, 50 mM) kullanıldı. %10'luk gliserol çözeltisi ile karıştırılarak hazırlanan Q-Sefaroz iyon değişim kolon kromatografisi sonunda elde edilip aktivite veren tüplerdeki örnekler birleştirilerek dengelenen kolona uygulandı. Toplanan elüatlarda sırasıyla; 280 nm'de kalitatif protein tayini, lipaz aktivite ve kantitatif protein tayini yapıldı. Spesifik aktivite hesaplanarak saflaştırma oranı belirlendi (Ekinci ve ark. 2015).

Üçlü faz ayırma sistemi (Three-Phase Partitioning, TPP)

A.pallidus IO3 bakterisinin ürettiği lipaz enziminin saflaştırılmasında ikinci bir metot olarak üçlü faz ayırma sistemi (TPP) kullanıldı. Kullanılan bu saflaştırma stratejisi sistemde bulunan protein yapılarının salting-out, izo-iyonik çökeltme, ozmolitik ve kozmo-tropik presipitasyon ile ko-solvent presipitasyonu gibi çeşitli teknikleri kapsayan bir biyo-ayırma metodudur (Katı 2013). Uygulanan TPP saflaştırma stratejisi ham ekstrakt elde edildikten sonra ilk olarak tuz daha sonra ise organik çözelti eklenmesiyle ve gerekli olan uygun şartların sağlanması aşamasından sonra 1 saat bekletilmesiyle alt faz, ara faz ve organik çözeltiyi içeren üst faz olmak üzere üç faz oluşması esasına dayanır.

Bu çalışmada TPP stratejisi için tuz olarak amonyum sülfat tuzu ve organik çözücü olarak ise *tert*-bütanol kullanıldı (Alçıçek 2017).

TPP işlemiyle saflaştırmada en iyi verimi elde edebilmek için en uygun amonyum sülfat yüzdesi ve en uygun t-bütanol oranı mutlaka optimize edilmelidir. Bunun için ise sistem 2 mL homojenat ile farklı amonyum sülfat doyumluğunda (%20, %30, %40, %50, %60, %70, %80, w/v) ve farklı homojenat:t-bütanol oranlarında (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) ve farklı pH değerlerinde (5,0-12,0) hazırlandı. Karışımın oda sıcaklığında 1 saat inkübasyonundan sonra 5500 rpm'de 10 dk santrifüjlendi ve faz ayrımı gözlemlendi. Üst faz pipetle uzaklaştırıldıktan sonra, ara ve alt faz toplanarak her ikisine de enzim aktivite ve kantitatif protein tayini yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak saflaştırma katsayısına karşı yüzde geri kazanım grafikleri oluşturuldu (Alçıçek 2017).

SDS PAGE ile enzimin saflığının ve molekül kütlesinin belirlenmesi

TPP ve kolon kromatografisi saflaştırma stratejileri ile saflaştırılması gerçekleştirilen lipaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini belirlemek için SDS PAGE analizi yapıldı. Bunun için elektroforez plakaları ilk önce su ve daha sonra alkol ile yıkandı. İki cam plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Kısıkaçlarla sabitleştirilen plakalar jel hazırlama kabinine yerleştirildi. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve 5 mL'lik mikropipet yardımıyla üst kısmında 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Hava kabarcıklarının oluşmasının engellemek amacıyla izo-propanol plakalardan taşıncaya kadar döküldü. Ayırma jelinin katılaştığından emin olduktan sonra jelin üst kısmında bulunan izo-propanol uzaklaştırıldı. Ardından yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan yığma jeli, ayırma jelinin üst kısmına dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için öncesinde izo-propanol içerisinde bekletilen tarak dikkatlice yığma jeline yerleştirildi. Jelin donması için oda koşullarında yarım saat beklendi

ve yığma jelinin donduğundan emin olunduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılarak numune kuyuları belirlendi ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi.

Elektroforez tankı belirli olan kısmına kadar yürütme tamponu ile dolduruldu, enzim örnekleri ve yükleme tamponu 1:1 oranında 10 µL olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı. Sonra numuneler 5 dk kaynar suda bekletildi. Öncelikli olarak markır 4 µL miktarda ilk kuyucuğa yüklendi ve 18 µL olacak şekilde örnekler diğer kuyucuklara mikro-pipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafı anot üst tarafı katot olacak şekilde yerleştirildi. Önce 60 voltta 30 dk yürütme yapıldı. Akrilamid yoğunluğu düşük olduğu için örnekler 30 dk süresince ayırma jeline kadar gelip yığılma gösterdi. Sonra akım şiddeti 120 volta çıkarılarak 1 saatlik süre boyunca ve numuneler jelin alt kısmına gelinceye kadar yürütüldü. Ayırma jeline akrilamid yoğunluğu fazla olduğundan protein nitelikli numunelerin molekül kütlelerine göre ayrılması sağlandı.

Numunelerin takip edilmesi ve kolay yüklenebilmesi, yürütme tamponunda bulunan brom-timol mavisi sayesinde gerçekleştirildi. Yürütme işlemi bittikten sonra güç kaynağından akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Daha sonra ise gümüş boyama yapılarak bantlar belirginleşince jelin en uygun görüntüsünün fotoğrafı çekildi (Laemmli 1970).

Örneklerin gümüş boyama metodu ile boyanması

Örnekler jel elektroforezi ile yürütülüp, plakalar yürütme kabından çıkarılıp jel düz bir boyama kabı içerisine alındıktan sonra hazırlanan tespit çözeltisiyle 30 dk boyunca karanlık ortamda çalkalandı. 30 dk sonunda tespit çözeltisi dökülüp jel distile su ile yıkandı. Yıkama işleminin hemen ardından jel redüksiyon çözeltisi ile kap içerisinde muamele edildi ve 30 dk karanlık ortamda çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra redüksiyon çözeltisi kaptan uzaklaştırılarak yıkama işlemine geçildi. Bu işlem distile su ile 3 kez 5'er dakika olacak şekilde tekrarlandı. Bu süre zarfında hazırlanan boyama çözeltisi yıkama işlemi bittikten sonra kaba eklendi ve 20 dk yine karanlık ortamda çalkalamaya bırakıldı. Boyama çözeltisi jel ve kaptan uzaklaştırıldıktan sonra jel bantlar belirginleşinceye kadar yıkama 1 çözeltisi ile elde çalkalandı. Jelde bantlar görünmeye başladığı andan itibaren en iyi görüntü yakalanarak yıkama 1 çözeltisi uzaklaştırılıp yıkama 2 çözeltisi eklendi ve gümüş boyama işlemi sonlandırıldı (Alçiçek 2017).

***A.pallidus* IO3 Bakterisinden Saflaştırılan Lipaz Enzimi İçin Yapılan Karakterizasyon alışmaları**

Lipaz enzimi için optimum pH ve stabil pH belirlenmesine yönelik yapılan alışmalar

A.pallidus IO3'ten saflaştırılan lipaz enzimi için optimum pH'nın belirlenebilmesi amacıyla 200 µL enzim ile 50 mM'lık 1 mL sodyum asetat (pH: 4,0-6,0), KH₂PO₄ (pH: 6,0-8,0), Tris-HCl (pH: 8,0-9,0) ve Glisin-NaOH (pH: 9,0-12,0) tampon çözeltileri ile 1 mL paranitrofenol palmitat substrat çözeltisi karıştırıldı ve lipaz enzimi aktivite tayin protokolü uygulanarak 55°C'de 10-15 dk'lık süre boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak için 2 mL Na₂CO₃ eklendi ve renk değişimi beklendi. Spektrofotometrik olarak 410 nm'de ölçüm yapıldı. Enzimin en yüksek aktiviteyi verdiği pH değeri, optimum pH olarak belirlendi.

Enzimin stabil pH'sını belirlemeye yönelik olarak ise sodyum asetat (pH: 5,0-6,0), KH₂PO₄ (pH: 6,0-8,0), Tris-HCl (pH: 8,0-9,0) ve Glisin-NaOH (pH: 9,0-12,0) tampon çözeltileri kullanıldı. 15 mL'lik falkon tüplerine 1 mL tampon çözeltilerinden (12 farklı pH'daki tamponlar) konuldu ve üzerine 1 mL lipaz enzimi eklendi. Oda koşullarında 1 saatlik inkübasyon süresine bırakıldıktan sonra enzim aktivite tayini yapıldı. Enzimin inkübasyon öncesi aktivitesi 100 olarak kabul edilerek 1 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen aktivite değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek kalan aktivite yüzdesi olarak hesaplandı (Rahman *et al.* 2006; Venugapol and Saramma 2007).

Lipaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklık değerlerinin belirlenmesine yönelik yapılan alışmalar

A.pallidus IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 600 µL enzim (pH: 8,0, 50 mM'lık) Tris-HCl tamponu ve 3 mL substrat çözeltisi (0,03 g paranitrofenol palmitat/10 mL izopropanol) karıştırıldı ve 15 dk süreyle 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrasında her bir sıcaklık değeri için 3 tekerrür olacak şekilde lipaz enzim aktivite tayini yapıldı. En yüksek aktivitenin grldği sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlendi ve diğer sıcaklık değerleri ona göre bağlı aktivite cinsinden hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Saflaştırılan lipaz enziminin sıcaklık yönünden stabilitesini belirlemek için ise 600 µL enzim zeltisi 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık değerlerinde (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C) her bir sıcaklık değeri için 30, 60, 90 ve 120 dk'lık srler boyunca inkübasyona bırakıldı. Belirtilen srelerin sonunda lipaz enzimi aktivite tayin protokolü uygulanarak enzim

aktivitesi belirlendi. İnkübasyon öncesi aktivite miktarı 100 olarak kabul edilerek farklı sıcaklık değerlerindeki bağıl aktivite hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Bazı metal iyonlarının *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar

Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, K⁺ ve Li⁺ metal iyonlarının *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesine etkisi incelendi. Metal iyonlarının 1 mM'lık ve 10 mM'lık olacak şekilde (pH: 8,0, 50 mM'lık) Tris-HCl tamponu ile 50 mL'lik çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan metal iyonu çözeltilerden 2,5 mL alınarak üzerine 500 µL enzim çözeltisi ilave edildi. 30 dk'lık inkübasyon süresinin sonunda lipaz aktivite tayini yapıldı. Aktivite farkını gözlemleyebilmek amacıyla metal iyonlarını içermeyen enzimin aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve metal iyonu içeren örneklerin aktivitesi, kalan aktivite olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Bazı organik çözücülerin *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar

Saflaştırılan lipaz enziminin organik çözücülerin bulunduğu ortamda aktivitesindeki değişimi incelemek amacıyla; metanol, etanol, kloroform, izopropanol, bütanol, aseton, *tert*-bütanol, DMSO ve gliserol organik çözücülerinin %25'lik ve %50'lik konsantrasyonlarıdaki çözeltileri hazırlanıp kullanıldı. Her bir organik çözücü pH: 8,0 50 mM'lık Tris-HCl tamponu içinde çözdürülerek hazırlandı. 500 µL enzim ile 1,5 mL organik çözücü-tampon çözeltisi karıştırılarak 50°C'de 1 saat ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı, inkübasyon süresi sonunda lipaz enzimi aktivite tayini yapıldı. Organik çözücü içermeyen enzimin aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Organik çözücü içeren örneklerin aktivitesi ise kalan aktivite olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Bazı inhibitörlerin *A. pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar

A.pallidus IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine bazı inhibisyon ajanlarının etkisini belirlemek amacıyla DNTB, IAA, EDTA 1 ve 10 mM olacak şekilde 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu ile çözeltileri hazırlanılarak kullanılırken; PMSF inhibisyon ajanı ise %96'lık etanol çözeltisi ile hazırlanarak kullanıldı. β -Merkaptaetanol ise %1'lik ve %5'lik konsantrasyonlarda olacak şekilde 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponunda çözdürülerek hazırlandı. 900 µL hazırlanan inhibisyon çözeltilerinin üzerine ise 200 µL enzim çözeltisinden eklenerek 50°C'de 180 rpm' de 30 dk çalkalayıcıda bekletildikten sonra lipaz enzimi aktivite tayin protokolü uygulandı. Aynı koşullarda inkübasyona bırakılan 900 µL 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu

üzerine 200 µL enzim çözeltisi eklenerek hazırlanan kontrol grubunun aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve inhibitör içeren örneklerin aktivitesi kalan aktivite olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

***A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine bazı sürfaktanların ve okside edici ajanın etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar**

Sürfaktanlardan Triton X-100, Tween 20, Tween 80, SDS ve okside edici ajan olarak H₂O₂ %1 ve %5'lik konsantrasyonlarda olacak şekilde 10 mL'lik çözeltileri 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu ile hazırlandı. Hazırlanan çözeltilerden 900 µL alınarak 200 µL enzim çözeltisinin üzerine eklenip yarım saat 50°C'de 180 rpm'de çalkalamalı inkübatöre bırakıldı. 30 dk sonunda lipaz aktivite tayin protokolü uygulanarak 900 µL 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu ve 200 µL enzim içerecek şekilde hazırlanıp aynı koşullarda inkübasyona bırakılan kontrolün aktivitesi 100 olarak kabul edildi. 30 dk'lık inkübasyon sonrası aktiviteler ise kalan aktivite olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

***A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesini belirlemeye yönelik çalışmalar**

Substrat spesifitesini belirlemek amacıyla paranitrofenol palmitat, paranitrofenil asetat, paranitrofenil oktanat, paranitrofenil decanoate substratlarının 20 mM'lık çözeltileri izo-propanol ile hazırlandı. 1 mL substrat çözeltisi, 1 mL 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu ve 200 µL enzim çözeltisi karıştırılarak lipaz enzimi aktivite tayin protokolü uygulandı. En yüksek aktiviteyi gösteren substratın aktivitesi 100 olarak kabul edildi ve diğer substratların vermiş olduğu aktivite ona göre bağlı aktivite olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

***A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi için K_m ve V_{max} kinetik parametrelerini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar**

Saflaştırma işlemi gerçekleştirilen lipaz enziminin kinetik parametreleri olan K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla her biri için 200 µL enzim çözeltisinin kullanıldığı, izo-propanol içerisinde çözdürülerek hazırlanan 0,1- 2 mM'lık 7 farklı paranitrofenol palmitat substrat çözeltisi için aktivite tayini protokolü uygulanarak spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi belirlendi. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve çizilen bu grafikten faydalanarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı (Laemmli 1970; W. Yang *et al.* 2016; Malekabadi *et al.* 2018).

Ticari Olarak Piyasada Satılan Bazı Katı ve Sıvı Deterjanların *A.pallidus* IO3 Bakterisinden Saflaştırılan Lipaz Enzimi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Saflaştırılan lipaz enziminin Ariel, OMO, Alo, Bor On katı deterjanlarının ve Ariel sıvı ve OMO sıvı deterjanlarının varlığında aktivite durumu incelendi. Bu deterjanların %1 (w/v)'lik konsantrasyonlarında çözeltileri çeşme suyu ile çözdürülerek hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler kaynatıldı. 900 µL deterjan çözeltisine 200 µL enzim çözeltisi eklenerek 50°C'de 180 rpm'de çalkalayıcıda 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. Aynı miktarlar ile hazırlanan ve içerisinde deterjan çözeltisi olmayan örnek kontrol grubu olarak belirlenip aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyon sonunda lipaz enzimi aktivite tayin protokolü uygulandı ve kontrolün aktivitesi 100 olarak kabul edildi. Diğer örneklerin aktiviteleri de kontrole göre kalan aktivite olarak hesaplandı (Malekabadi *et al.* 2018).

Yağ lekelerinin gideriminde saflaştırılan lipaz enziminin kullanımı

A.pallidus IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin çeşitli yağ lekelerinin giderilmesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla 15 adet dikdörtgen şeklinde hazırlanan kumaş parçalarının üzerine, 1 gece öncesinden katı nitelikli tereyağı içeren yemek yağı lekesi, kakao yağı içeren çikolata lekesi, kozmetikte kullanılan bebek yağı lekesi, bitkisel nitelikli çörekotu yağı lekesi ve makine ile bisiklet zincirlerinin yağlanması için kullanılan zincir yağı lekesi yeterli büyüklükte bırakıldı. 250 mL'lik erlenlere lekeli kumaş parçaları yerleştirildi. Erlenlerin hepsi her bir leke türü için 3 farklı erlen olacak şekilde ayrıldı. Erlenlerden 1.'si kontrol grubu, 2.'si deterjan içeren grup, 3.'sü ise saflaştırılan lipaz enzimini içeren grup olarak ayrıldı. Erlenlerden 1.'sine 10 mL 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu eklendi ve son hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlandı; 2.'sine 1 mL sıvı deterjan, 10 mL 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu eklendi ve son hacim 50 mL'ye distile su ile tamamlandı; 3.'süne ise 1 mL enzim, 10 mL 50 mM'lık pH: 8,0 olan Tris-HCl tamponu eklendi ve son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı. Tüm işlemler her 5 leke türü için tekrarlanarak erlenler hazırlandı. Daha sonra, 50°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde (180 rpm) 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldı ve görüntüleri alındı (Malekabadi *et al.* 2018).

Verilerin İstatistiksel Analizi

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde GraphPad prism 5 (Graphpad, La, jolla, CA) software 7.0 istatistik analiz programı kullanıldı.

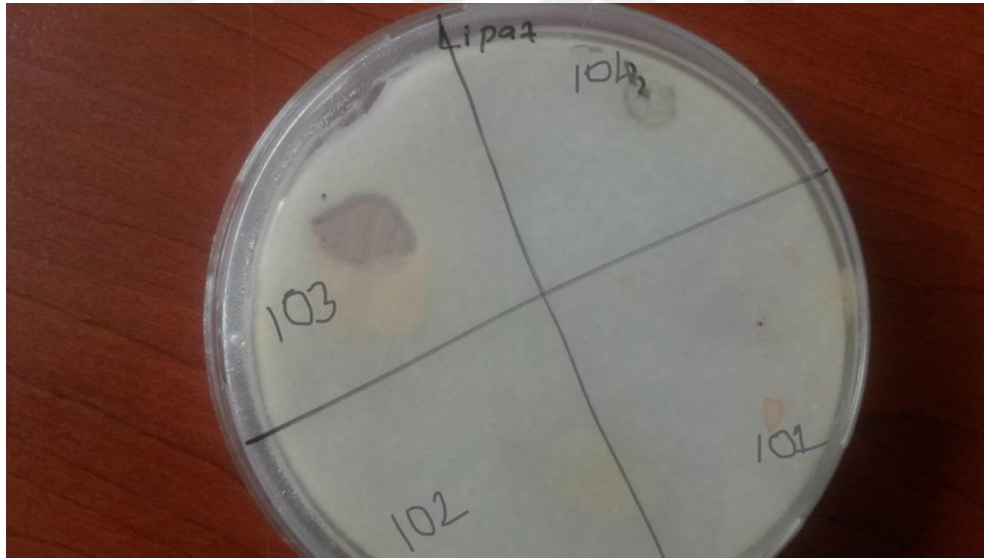
ARAŞTIRMA BULGULARI

Termofilik Bakterileri İzolasyonu

Bu çalışmanın ilk aşamasında; aseptik koşullar altında laboratuvar ortamına getirilen Erzurum ili Ilıca İlçesi Kaplıcası'ndan temin edilen termal su ve çamur örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirildi. Aşama sonunda toplam 11 bakteriyal izolat (O1-O11) elde edilerek, konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle karakterizasyon işlemlerine geçildi.

Lipaz Enzim Üreten Bakterilerin Tribütirin Agar Besiyerinde Belirlenmesi

TSB besiyerinde büyütülen 11 izolatın her biri farklı Tribütirin agar besiyerine ekildi ve petrilerde oluşan şeffaf zon bakterilerin lipaz üretilip üretilmediği sonucuna ulaşmamızı sağladı. Elde edilen 11 izolattan 8 tanesinin kolonilerinin etrafında şeffaf bir açıklık gözlenmesine karşın, en büyük zon çapı IO3 suşunda görüldüğünden, lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu için bu bakteri tercih edildi.



Şekil 3. Tribütirin agar besiyerinde lipaz üreticisi suşun lipaz aktivite görüntüsü ve zon oluşumu

Tablo 9. İzolatın morfolojik fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri

	Morfolojik				Biyokimyasal		Fizyolojik		
	Hücre morfolojisi	Gram	Endospor	Hareketlilik	Oksidaz	Katalaz	pH	Sıcaklık	Tuz
IO3	Çubuk/Krem Renkli	+	+	+	+	+	7,0-9,0	45-55°C	%2-4

Genomik DNA izolasyonu

Test izolatın genomik DNA'sı Peomega (A2360 Kit protokolüne uygun olarak izole edildi ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek, DNA'nın saflığı kontrol edildi.

16S rRNA PCR

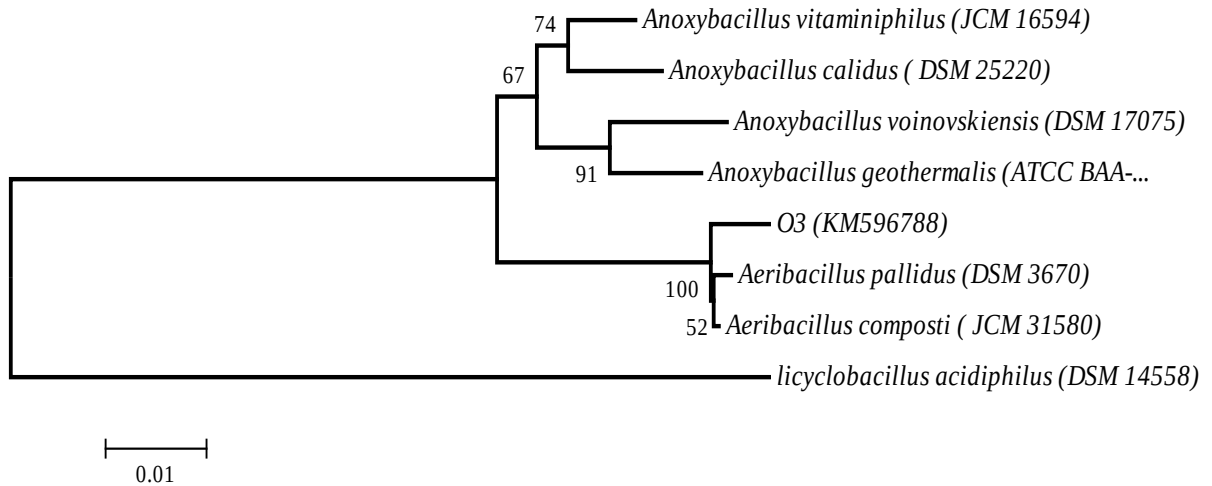
Bakteride bulunan 16S rRNA gen bölgesi 27F ve 1492R primerleri kullanılarak, amplifiye edildi. Daha sonra PCR örneği, %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve 1500 bp'lik tek bant profili elde edildi.

DNA dizi analizi

16S rRNA gen bölgesi amplifiye edildikten sonra uygun vektör sistemi kullanılarak klonlama işlemi gerçekleştirildi. Ardından örnek sekans analizleri için MacroGen (Hollanda) firmasına gönderildi.

Firmadan gelen test izolatının, 16S rRNA sekans verileri (1427 bp) anlamlı hale getirildikten sonra, Eztaxon'daki diziler ile kıyaslama yapıldı. Elde edilen veriler sonucunda IO3 suşunun %99 oranında *Aeribacillus pallidus* türüne benzediği tespit edildi ve MT705737 numarası ile Gen Bankasına girişi yapıldı.

Daha sonra test suşunun diğer termofilik yakın akraba bakteriyel türlerle olan taksonomik ilişkisini ortaya koymak için NJ (Neighbor-joining; Komşu Katılımı-Bağlama) yöntemi ile filogenetik ağaç çizildi.



Şekil 4. Filogenetik ağaç

***A.pallidus* IO3'ten Lipaz Enziminin Saflaştırılması**

Saflaştırma işlemi için iki farklı strateji uygulandı. İlk olarak amonyum sülfat çöktürmesi ve kromatografik yöntemlerden oluşan geleneksel saflaştırma metotları; ikinci olarak ise enzimlerin saflaştırılması için geleneksel yöntemlere alternatif olarak kullanılan bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi olan üçlü faz ayırma (TPP) metodu kullanıldı.

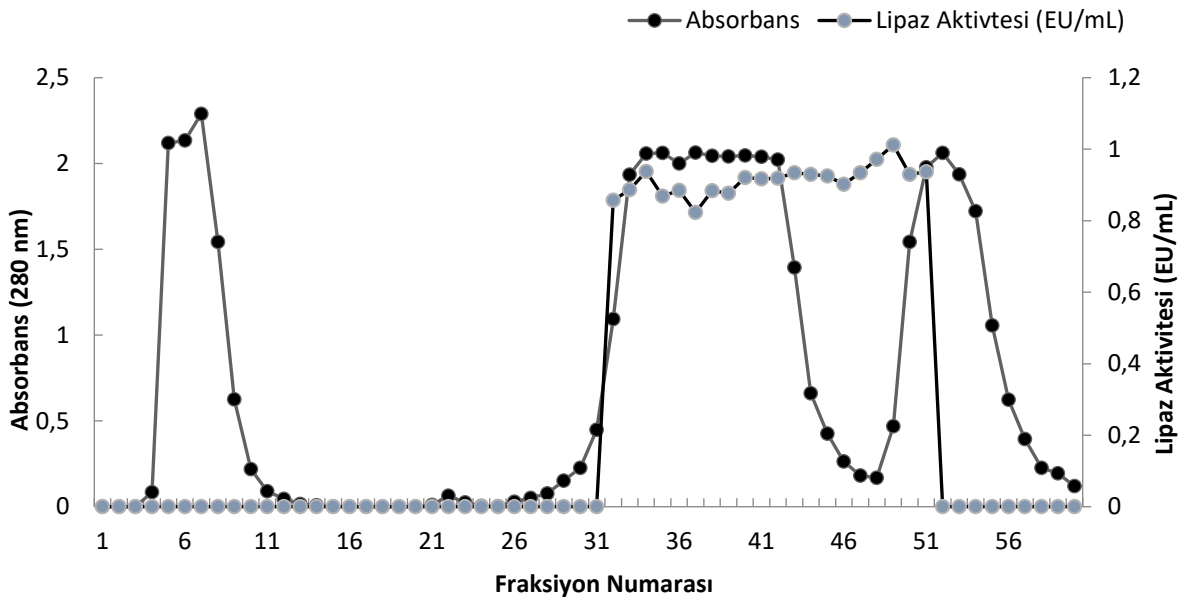
Lipaz Eziminin Geleneksel Saflaştırma Metotları ile Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

A.pallidus IO3 bakterisinin ekstraselüler olarak ürettiği lipaz enziminin saflaştırılmasının ilk aşaması olarak; homojenat elde edilmesi için, lipaz üretim besiyeri ile oluşturulan kültüre 6000 rpm'de 25 dk süre ile santrifüj yapıp, amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Amonyum sülfat aralığı %0-60 olarak belirlendi. Elde edilen çökelti pH'sı 8,0 olan 100 mM Tris-HCl tampon çözeltisinde çözüldü ve ardından diyaliz yapıldı.

İyon Değişim Kromatografisi

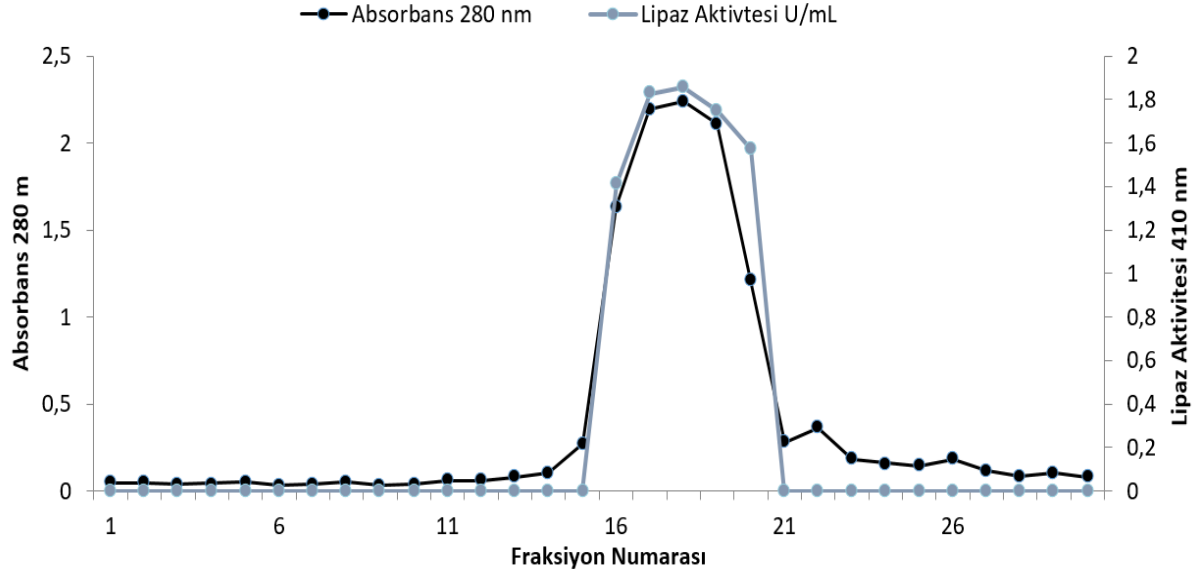
Saflaştırma için amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizin ardından enzim çözeltisi Q-Sepharose anyon değişim kolonuna tatbik edildi. Enzim %4,98 verimle 1,16 kat saflaştırıldı. Elde edilen sonuçlar **Şekil 5** ve **Tablo 10**'da gösterildi.



Şekil 5. Saflaştırılan lipaz enziminin iyon değişim kromatografisi kalitatif protein tayini sonuçları (280 nm) ve lipaz enzimi aktivitesi sonuçları (410 nm) grafiği

Jel Filtrasyon Kromatografisi

Lipaz enziminin saflaştırılması için iyon değişim kolonu sonunda elde edilen en yüksek aktivite gösteren elüatlar jel filtrasyon kolonuna yüklendi. Enzim jel filtrasyon kromatografisiyle %3,18 verimle 9,3 kat saflaştırıldı. Elde edilen sonuçlar **Şekil 6** ve **Tablo 10**'da gösterildi.



Şekil 6. Saflaştırılan lipaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi kalitatif protein tayini sonuçları (280 nm) ve jel filtrasyon kromatografisi enzim aktivitesi tayini sonuçları (410nm)

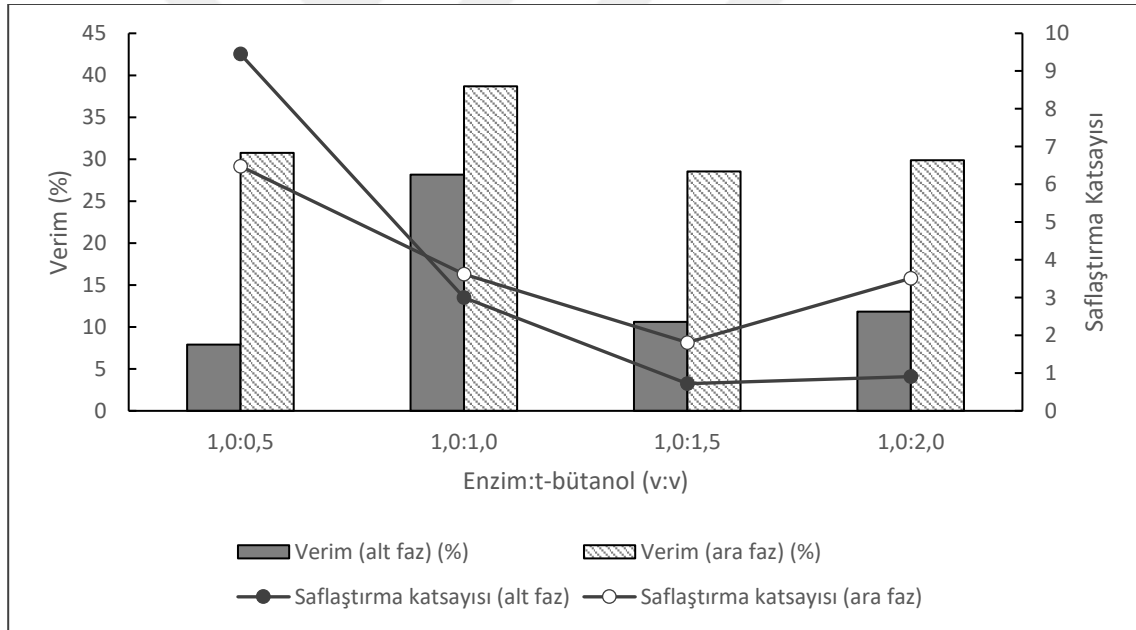
Tablo 10. A.pallidus IO3'den geleneksel yöntemler ile saflaştırılan lipaz enziminin saflaştırılma tablosu

Numune türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Aktivite (EU/mL)	Toplam Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	50	38,40	620,40	1920	31020	0,06	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	13	24,86	611,46	323	7949	0,04	16,86	0,66
Q-Sepharose Fast Flow İyon Değişim Kromatografisi	3	31,87	404	95,63	1212	0,07	4,98	1,16
Sefadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi	1,5	40,80	71,76	61,21	107,64	0,56	3,18	9,3

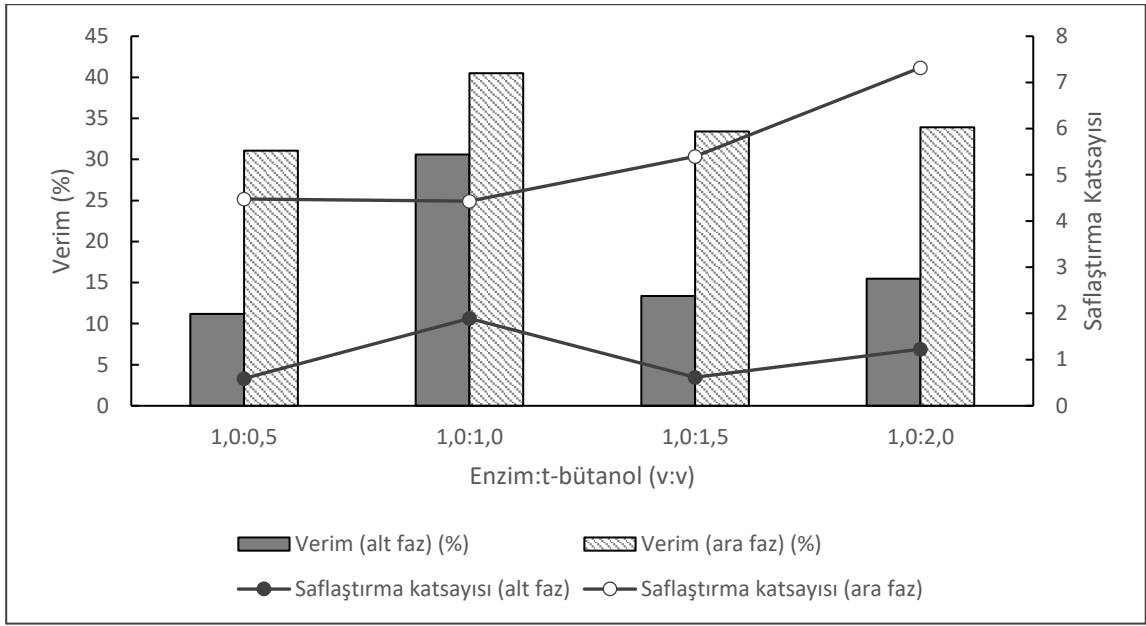
Lipaz Eziminin Üçlü Faz Ayırma (TPP) Sistemi ile Saflaştırılması

TPP sisteminde amonyum sülfat konsantrasyonu ve organik çözücü oranının etkisinin belirlenmesi

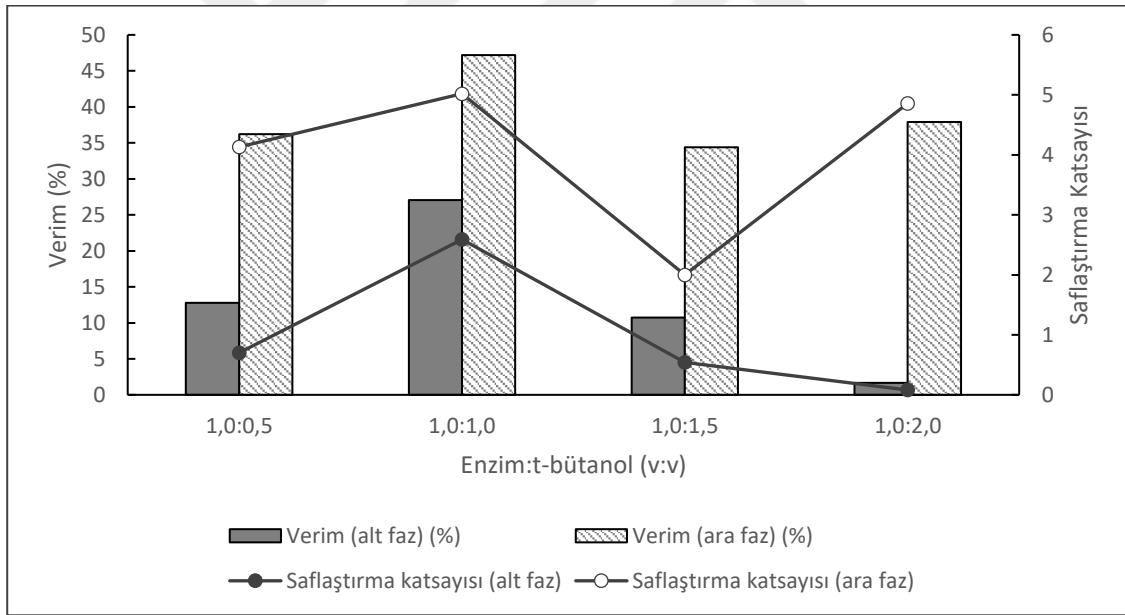
Literatürde sabit bir tuz konsantrasyonu seçilip bu tuz konsantrasyonlarıyla farklı homojenat:t-bütanol oranları denenerek alkol oranı belirlendikten sonra bu alkol oranıyla farklı tuz konsantrasyonları çalışılarak gerekli olan tuz miktarı belirlenmektedir. Optimizasyon işlemi için kullanılan diğer bir yöntem de her bir tuz konsantrasyonunda farklı homojenat:t-bütanol oranlarının denemesidir. Bu tez çalışması kapsamında farklı amonyum sülfat konsantrasyonları (%20, %30, %40, %50, %60, %70 ve %80) ve farklı homojenat:t-bütanol oranları (1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:1,2) kullanılarak 50°C’de optimizasyon çalışmaları yapıldı. Saflaştırılan lipazın ara fazda bulunduğu, en yüksek verimin ve saflaştırma katsayısının %40 amonyum sülfat doyumluğunda ve 1,0:1,0 homojenat:t-bütanol oranında elde edildiği görülmektedir (Şekil 7 – 13). Bu aşamadan sonraki saflaştırma işlemine bu oranlarla devam edildi.



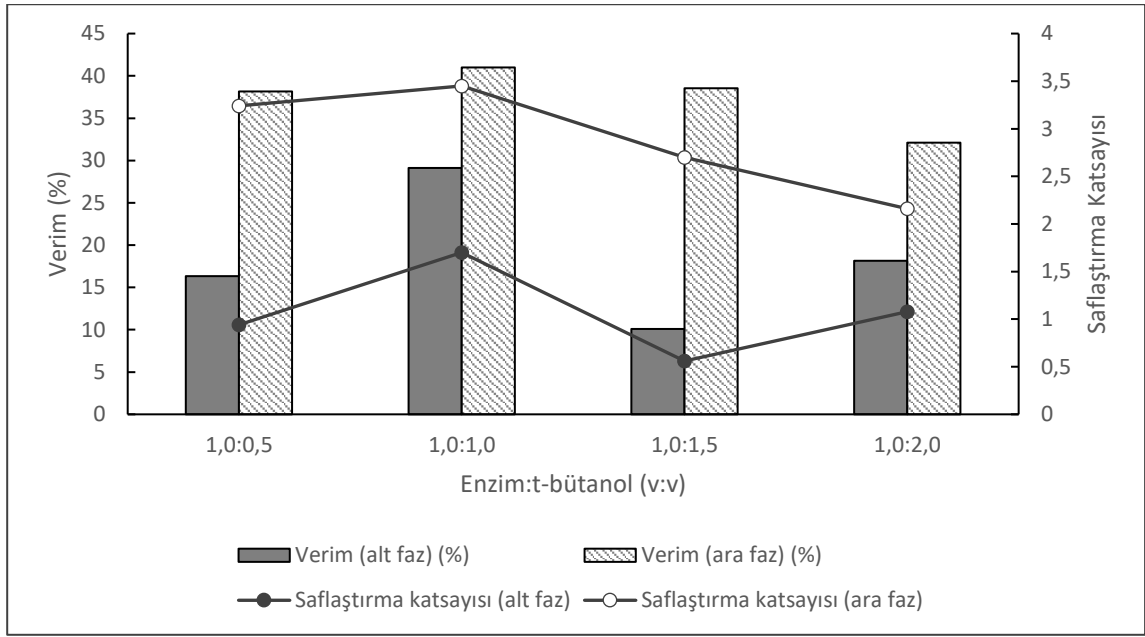
Şekil 7. TPP metodunun %20 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında farklı t-bütanol oranının (Homojenat:t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



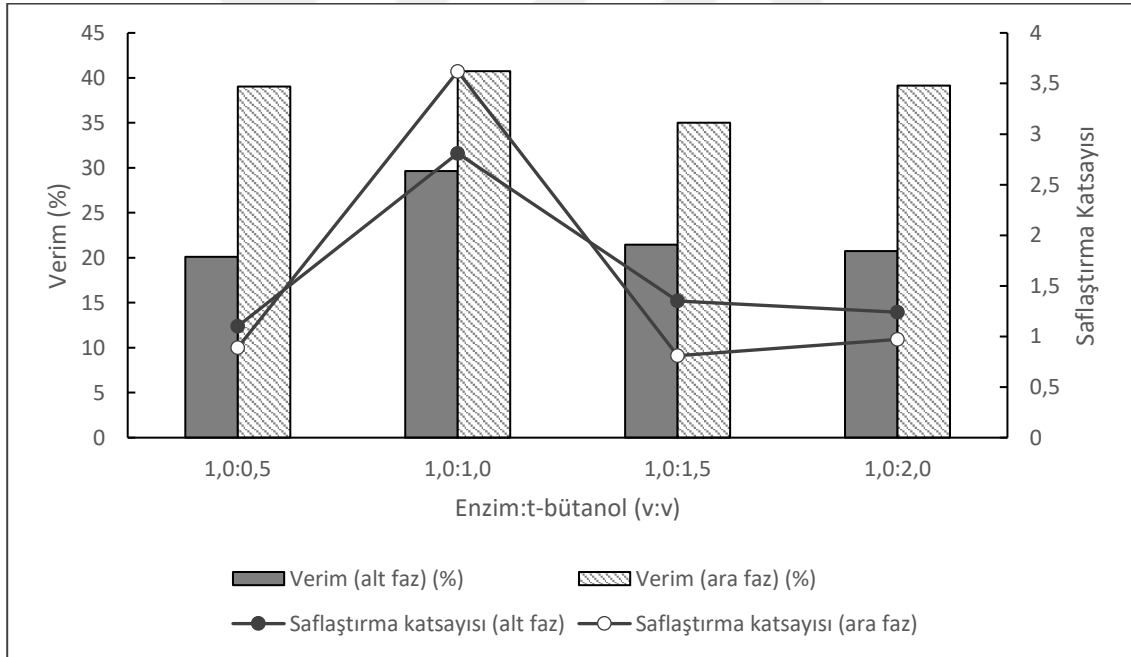
Şekil 8. TPP metodunun %30 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



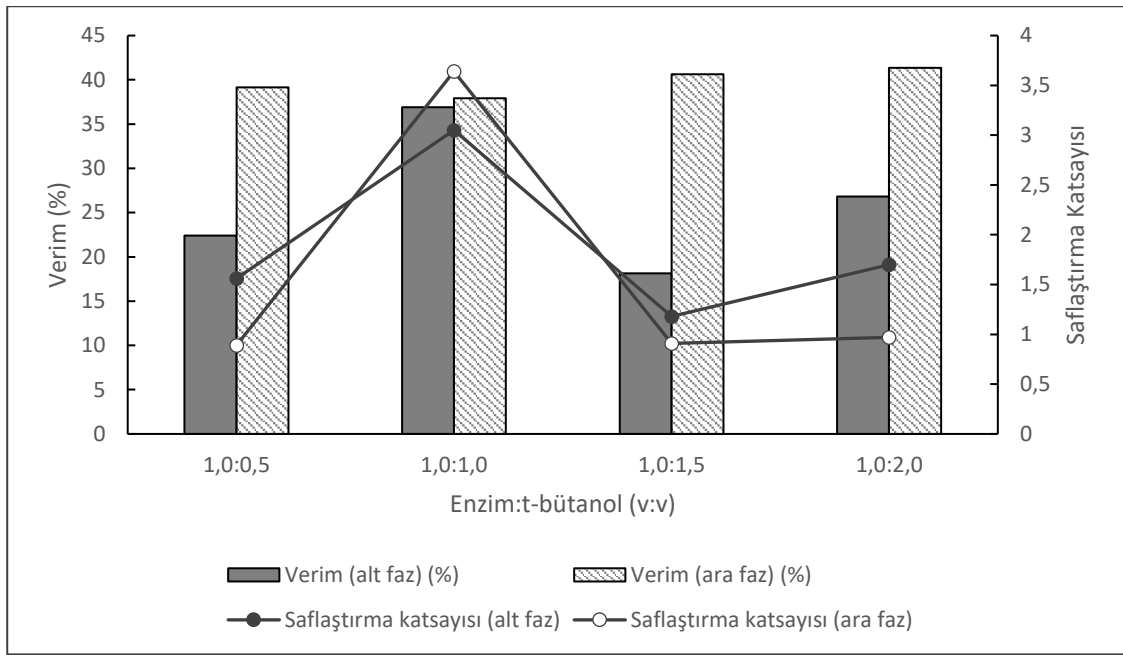
Şekil 9. TPP metodunun %40 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat:t- bütanol; 1,0:0,5, 1,0:1,0, 1,0:1,5, 1,0:2,0) A.pallidus IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



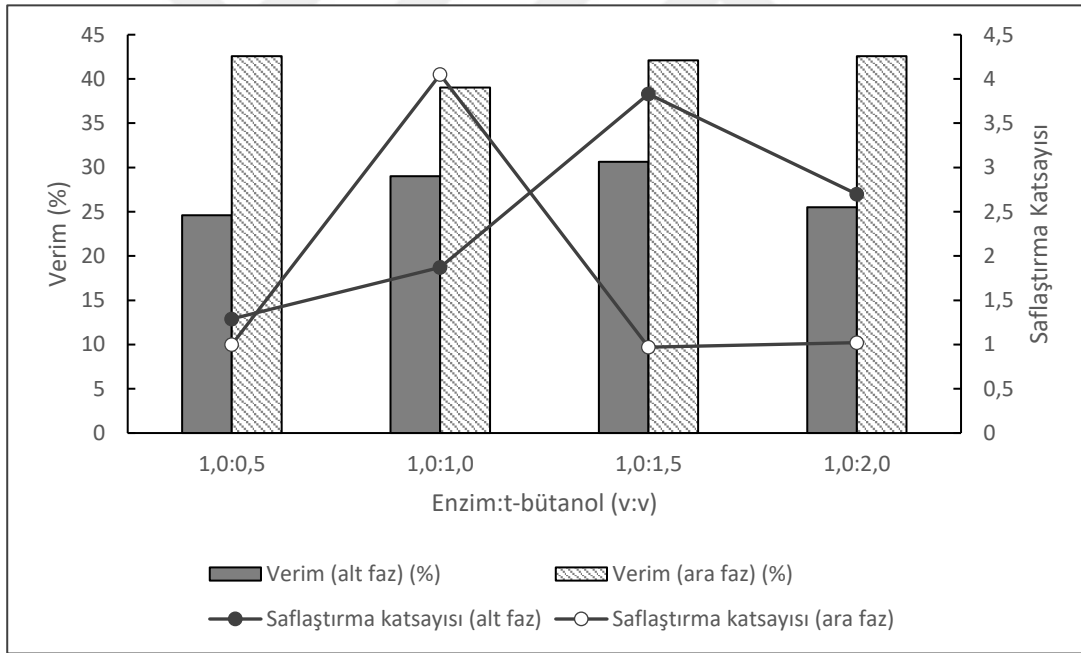
Şekil 10. TPP metodunun %50 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) *A.pallidus* IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



Şekil 11. TPP metodunun %60 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) *A.pallidus* IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi



Şekil 12. TPP metodunun %70 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) *A.pallidus* IO3 lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi

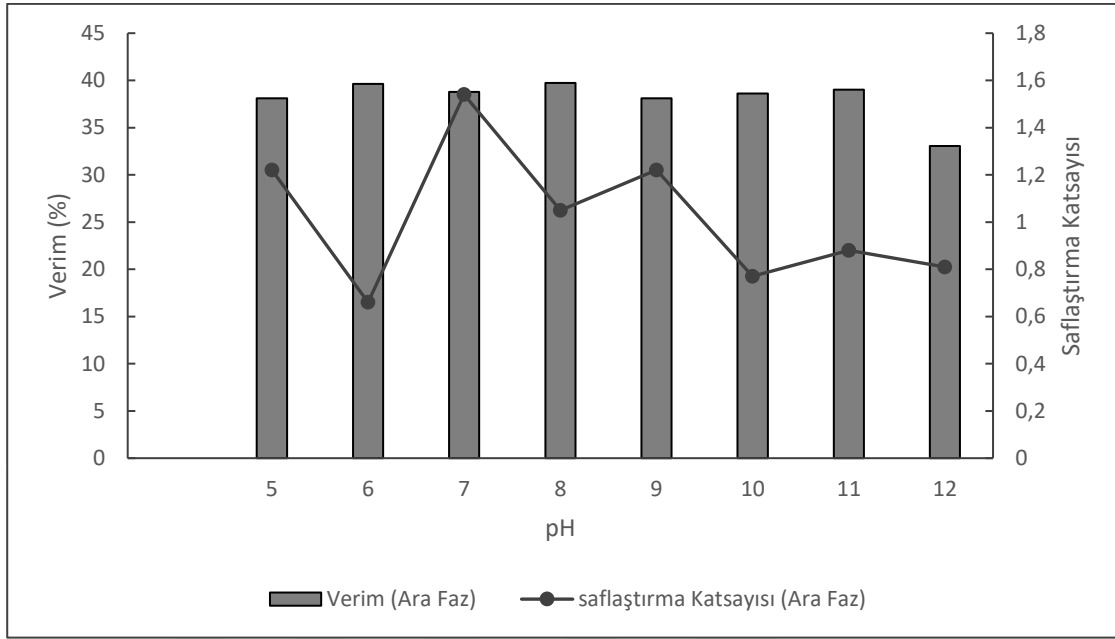


Şekil 13. TPP metodunun %80 amonyum sülfat konsantrasyonu varlığında, farklı t-bütanol oranının (Homojenat: t- bütanol; 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2.0) *A.pallidus* lipazının saflaştırma katsayısına ve verimine etkisi

***A.pallidus* IO3 lipazının saflaştırılmasında TPP sistemine pH'nın etkisi**

Üçlü faz ayırma sistemlerinde önemli bir diğer parametre sistemin pH'sıdır. pH değeri, saflaştırılması hedeflenen proteine ve proteinin iyon yüküne etki edip, fazlar arasında dağılımın farklılaşmasıyla ayırım sağlar (Katı 2013). Bu nedenle sistemin pH'sı TPP sistemini etkileyen önemli parametrelerden biridir ve optimize edilmesi gerekir. TPP işleminde en

uygun tuz yüzdesi ve organik çözügen belirlendikten (%40 tuz konsantrasyonu ve 1,0:1,0 oranında *t*-bütanol) sonra bu değerlere göre farklı pH değerlerinde işlemler tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar **Şekil 14**'de gösterildi.



Şekil 14. *A. pallidus* IO3 lipazının saflaştırılmasında TPP metoduna pH'nın etkisi

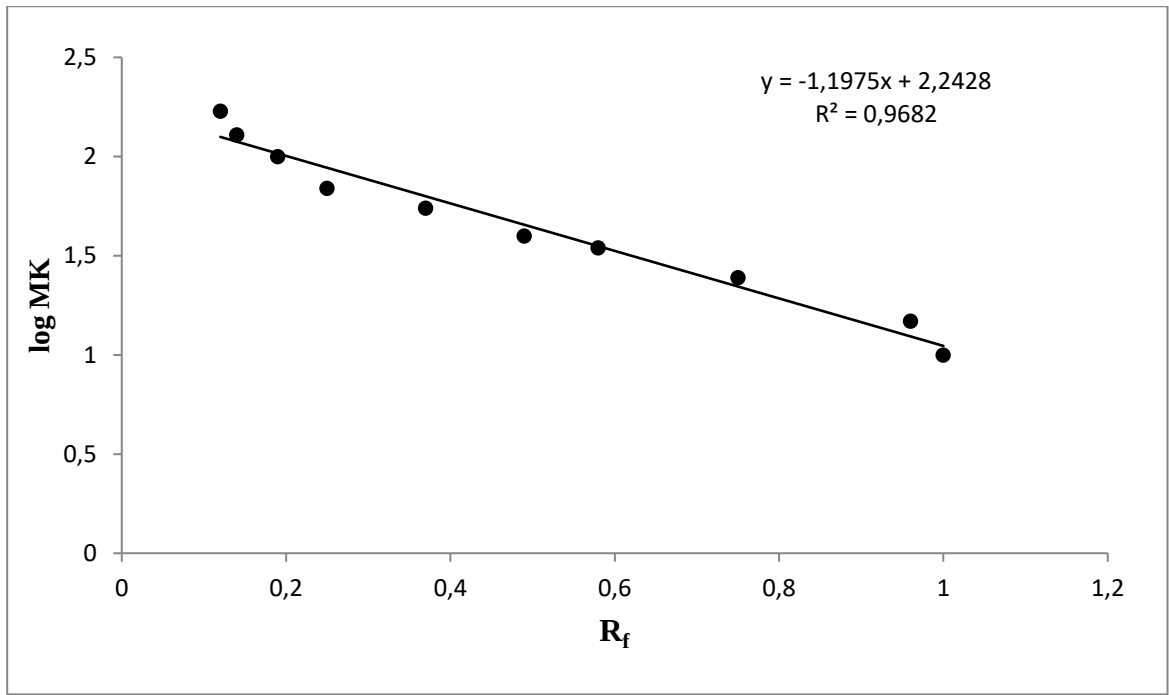
TPP ile saflaştırma işleminin yüksek verimle gerçekleştirilmesi için kullanılacak tuz konsantrasyonu, organik çözücü oranı ve uygun pH gibi saflaştırma sistemini etkileyen faktörlerin optimizasyonundan sonra belirlenen parametreler doğrultusunda; saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Saflaştırma sonuçları **Tablo 11**'de verildi. %40 (w/v) amonyom sülfat doygunluğunda; 1,0:1,0 homojenat:*t*-bütanol oranı ile lipaz enzimi, pH: 7,0'da %38,79 verimle 1,54 kat olarak TPP prosesindeki ara fazdan saflaştırıldı.

Tablo 11. *A. pallidus* IO3'den TPP yöntemiyle saflaştırılan lipaz enziminin saflaştırılma tablosu

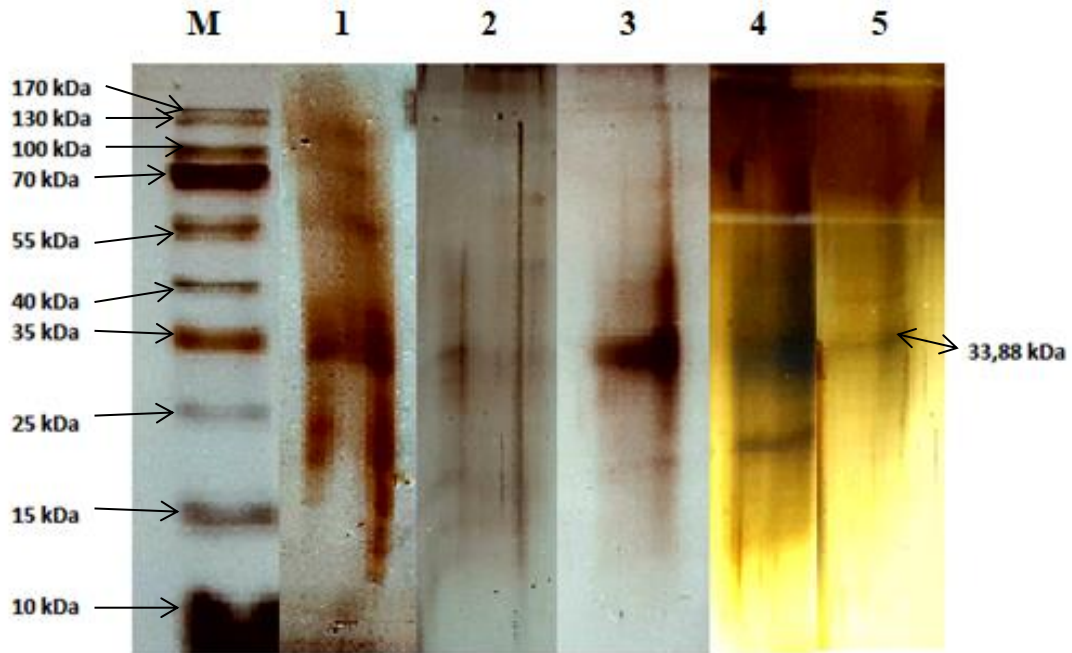
Numune türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Aktivite (EU/mL)	Toplam Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	2	12,54	81,58	25,08	163,16	0,153	100	1
TPP-Ara faz	1	9,73	97,47	9,73	97,47	0,099	38,79	1,54

SDS-PAGE ile Enzimin Saflık Kontrolü ve Molekül Kütlesi Tayini

A. pallidus IO3 bakterisinden çeşitli yöntemlerle saflaştırılan lipaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini tayin etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı (**Şekil 16**). Standart markır proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek, R_f değerleri hesaplandı. Log MK- R_f değerleri ile çizilen grafik **Şekil 15**'de gösterildi. Enzimin molekül kütlesi ~33,88 olarak hesaplandı.



Şekil 15. SDS-PAGE sonucu çizilen log MK-R_f grafiği



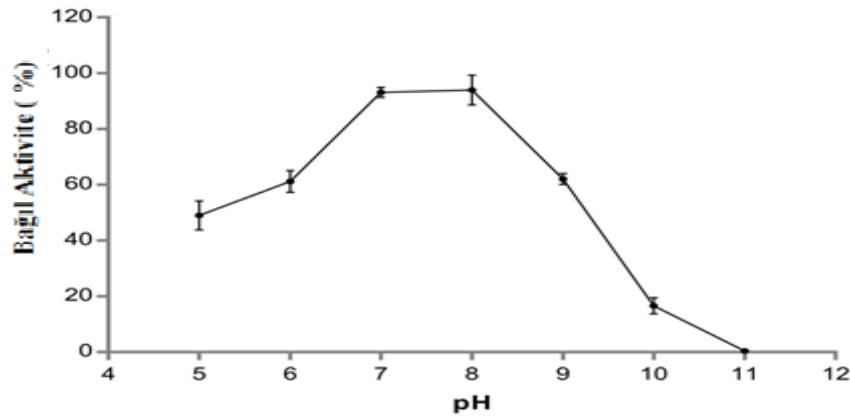
Şekil 16. SDS-PAGE Görüntüsü. M) Marker 1) Homojenat 2) TPP Alt-Faz 3) TPP Ara-Faz 4) İyon Değişim Kromatografisi 5) Jel Filtrasyon Kromatografisi

Enzim Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları

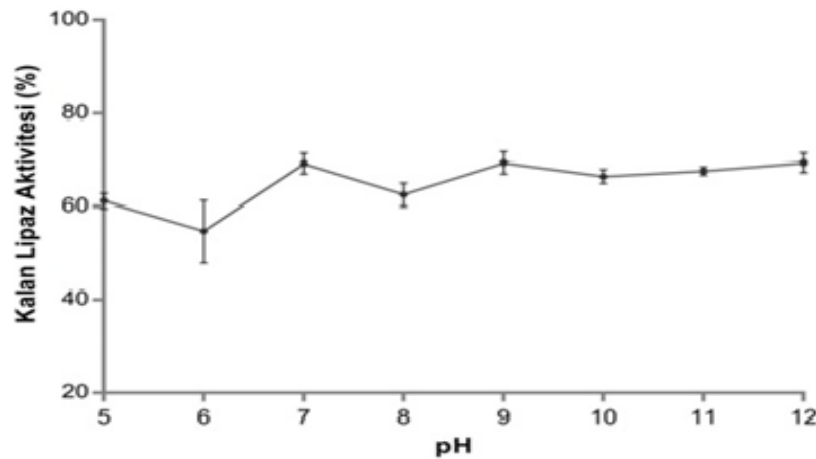
Lipaz enzimi için optimum pH ve stabil pH'nın bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmalar

A.pallidus IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi için, optimum pH ve stabil pH değerlerini belirlemeye yönelik olarak çalışmalar yapıldı. Elde edilen verilere göre çizilen grafikler incelendiğinde; saflaştırılan lipaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri

8,0 belirlenirken, enzimin stabil pH'sı için, tüm pH değerlerinde mevcut aktivitesinin, ortalama olarak %60 oranında korunduğu gözlemlendi.



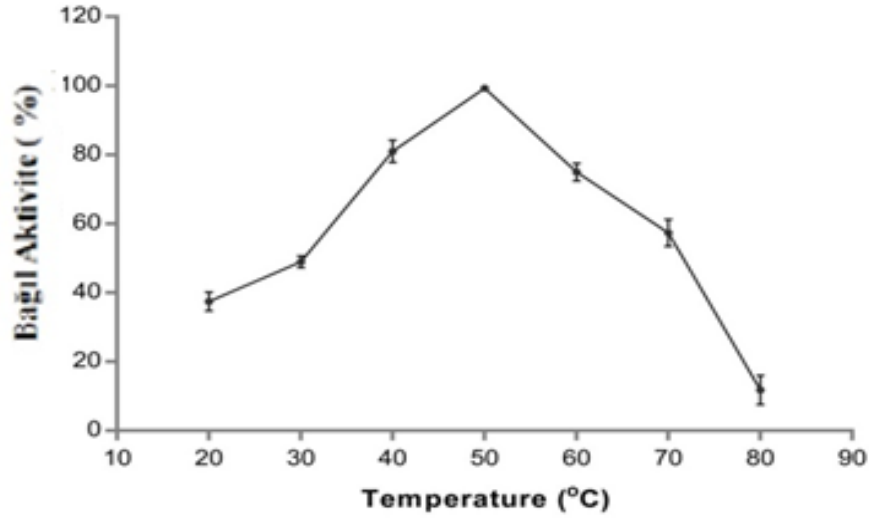
Şekil 17. Lipaz enziminin optimum pH'sı için oluşturulan ölçüm grafiği



Şekil 18. Lipaz enziminin stabil pH'sı için oluşturulan ölçüm grafiği

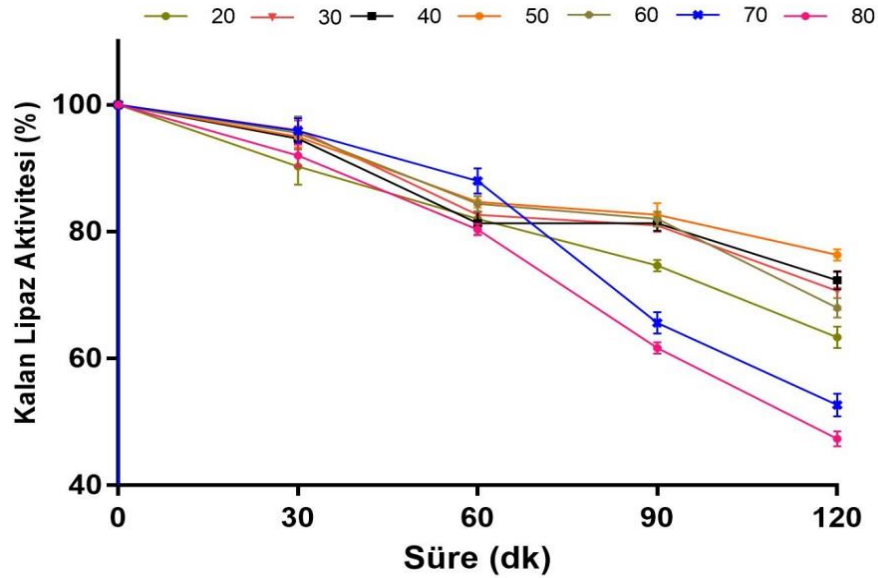
Lipaz enzimi için optimum sıcaklık ve stabil sıcaklığın bulunmasına yönelik olarak yapılan çalışmaları

A.pallidus IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin sıcaklık profili ve sıcaklık kararlılığı belirlendi. Enzimin optimum ve stabil sıcaklığını belirlemek amacıyla; 20 ve 80°C arasındaki farklı sıcaklık değerleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 19'da gösterildi. Enzimin optimum sıcaklığı 50°C olarak tespit edildi.



Şekil 19. Lipaz enziminin optimum sıcaklığı için oluşturulan ölçüm grafiği

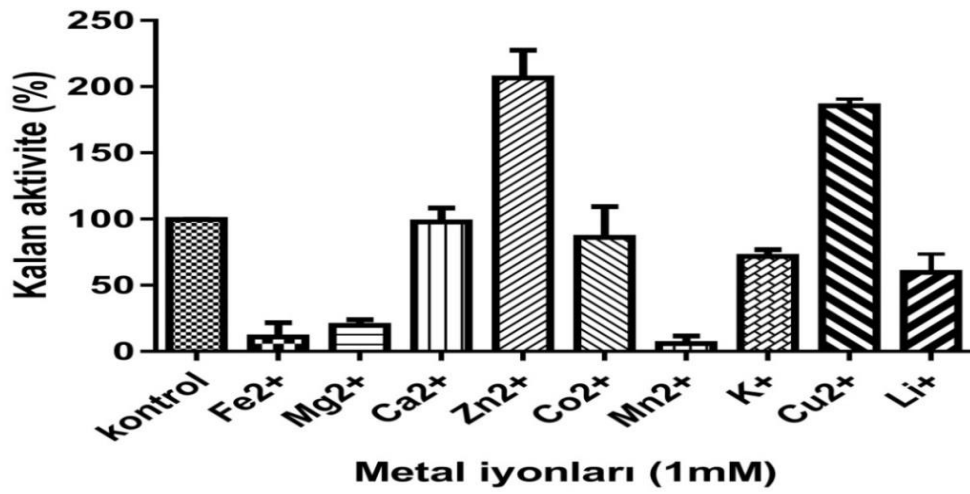
A.pallidus IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin sıcaklık stabilitesini belirlemek için, 20°C'den 80°C'ye kadar olan sıcaklık aralıklarında 30, 60, 90 ve 120 dk'lık sürelerle enzim inkübe edilip, her süre sonunda aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; saflaştırılma işlemi gerçekleştirilen lipaz enzimi için, 30 dk süre sonunda tüm sıcaklık değerlerinde aktivitenin %75'ten daha büyük oranda, 60 dk süre sonunda tüm sıcaklık değerlerinde aktivitenin %60 oranında, 90 dk süre sonunda aktivitenin %70'lik oranda ve 120 dk süre sonunda ise genel olarak mevcut aktivitenin %60'nın muhafaza edilip, tüm bu sıcaklık değerlerinin içerisinde ise, 50°C'de enzimin aktivitesinin stabil olduğu belirlendi ve sonuçlar **Şekil 20**'de gösterildi.



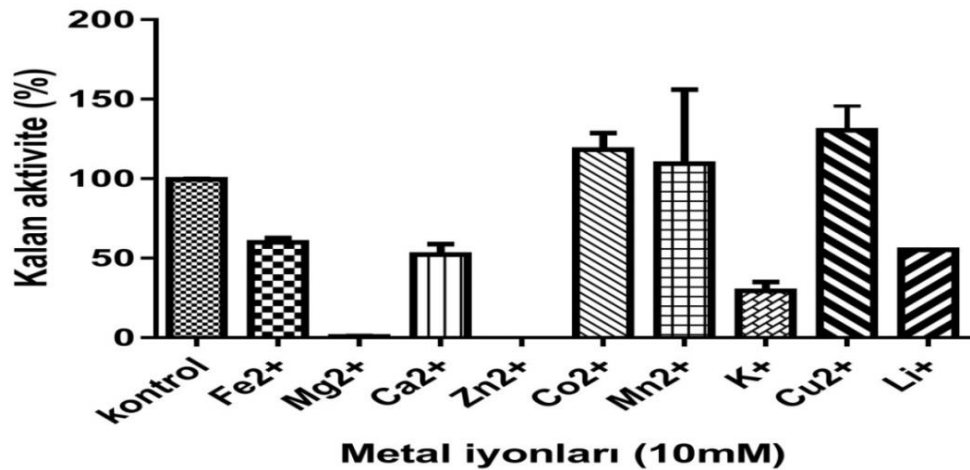
Şekil 20. Lipaz enziminin stabil sıcaklığı için oluşturulan ölçüm grafiği

Bazı metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzimine etkisini belirlemeye yönelik elde edilen sonuçlar

Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ve Cu^{2+} gibi +2 ve +3 değerliğe sahip metal iyonları ile K^+ ve Li^+ değerlikli metal iyonlarının *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesine etkisi incelemek amacıyla; iyonların 1 ve 10 mM'lık çözeltileri hazırlandı. Enzimin, 1 mM Ca^{2+} ve Co^{2+} metal iyonlarının varlığında aktivitesini koruduğu, Cu^{2+} ve Zn^{2+} 'da aktivitesini artırdığı, Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} metal iyonlarının varlığında ise, aktivitesini kaybettiği tespit edildi. 10 mM'lık konsantrasyonda ise, Zn^{2+} 'nın varlığında; enzimin inhibe olduğu, Co^{2+} , Cu^{2+} ve Mn^{2+} varlığında aktivitesini koruduğu belirlendi. Elde edilen veriler, Şekil 21 ve Şekil 22 ile ifade edildi.



Şekil 21. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi (1 mM)



Şekil 22. Bazı metal iyonlarının saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisi (10 mM)

Bazı inhibitörlerin saflaştırılan lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar

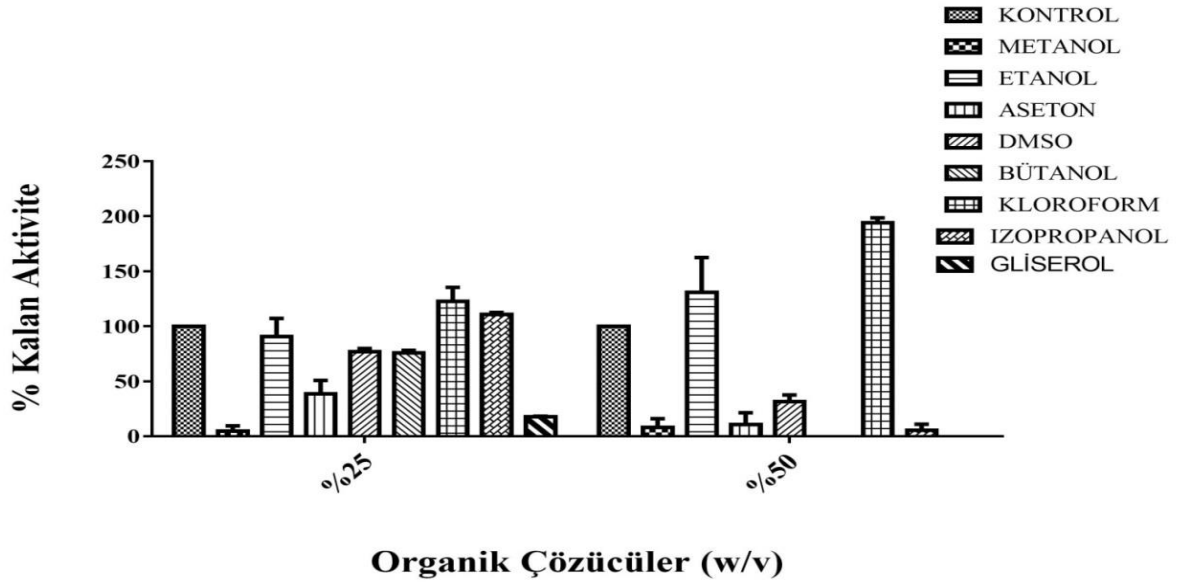
A.pallidus IO3 bakterisiden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon ajanlarının etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar için 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarda hazırlanan inhibisyon ajanlarının çözeltileri ile enzimin muamele edilmesi sonunda elde edilen veriler şekillerde gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ise DNTB, IAA, PMSF ve EDTA'nın her iki konsantrasyonunda da enzimin tamamen inhibe olduğu belirlendi. β -merkaptetanol'ün 1 mM'lık konsantrasyonunun varlığında, mevcut aktivitenin %23,6'sı korunurken, 10 mM'lık konsantrasyonunun varlığında ise, %7,6'sının muhafaza edildiği saptandı.

Tablo 12. Bazı inhibisyon ajanlarının 1 saatlik inkübasyon süresinde lipaz aktivitesi üzerine etkisi (1 mM ve 10 mM)

İnhibitörler	Kalan Aktivite (%) (1mM)	Kalan Aktivite (%) (10mM)
DNTB	0	0
EDTA	0	0
IAA	0	0
PMSF	1,28±0,75	0
β -Merkaptaetanol	23,6±2,4	7,6±3,149

Bazı organik çözücülerin *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalar

Bakteriden saflaştırılan lipaz enziminin DMSO, kloroform, etanol, metanol, bütanol, izopropanol gliserol ve aseton gibi organik çözücülerin %25 ve %50'lik konsantrasyonlarda 1 ve 24 saatlik inkübasyon süresinde lipaz enzimi üzerine etkisi araştırıldı. Elde edilen veriler sırasıyla **Şekil 23** ve **Tablo 13**'de verildi. Kloroformun her iki konsantrasyonda da, enzimin mevcut aktivitesini artırdığı; izo-propanolün 1 saatlik inkübasyon süresinde, düşük konsantrasyonunda enzim aktivitesinin artırdığı; yüksek konsantrasyonda ve 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise mevcut aktiviteyi düşürdüğü görüldü. İzopropanolün %25'lik konsantrasyonunda, 1 saatlik inkübasyonda aktivitede artma görülürken, düşük konsantrasyonda 24 saat sonunda enzimin aktivitesini kaybettiği belirlendi. Her iki konsantrasyon değerinde ise asetonun aktivite düşüşüne sebep olduğu tespit edildi. %25'lik konsantrasyon değerinde hem DMSO hem de bütanol organik çözücülerinde aktivitenin %75 oranında korunduğu belirlendi.



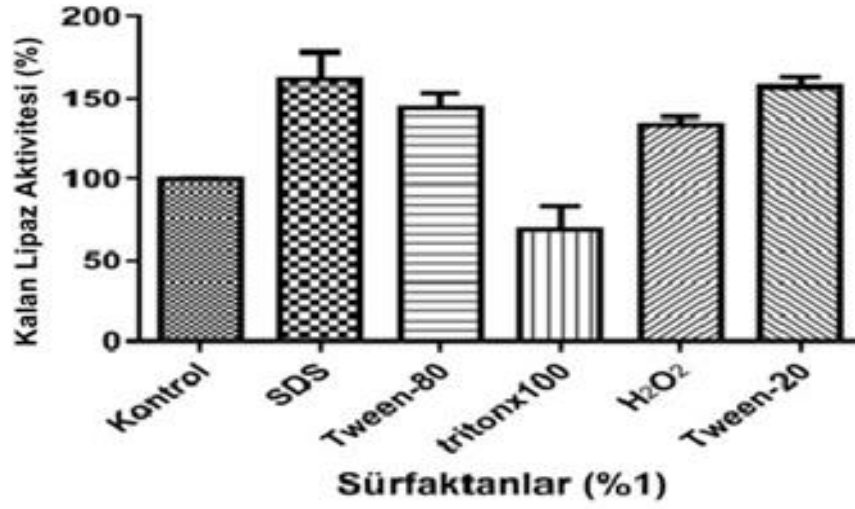
Şekil 23. Bazı organik çözücülerin 1 saatlik inkübasyon süresinde lipaz aktivitesi üzerine etkisi (%25’lik konsantrasyon ve %50’lik konsantrasyon)

Tablo 13. Bazı organik çözücülerin 24 saatlik inkübasyon süresinde lipaz aktivitesi üzerine etkisi (Kalan aktivite %25’lik konsantrasyon ve %50’lik konsantrasyon)

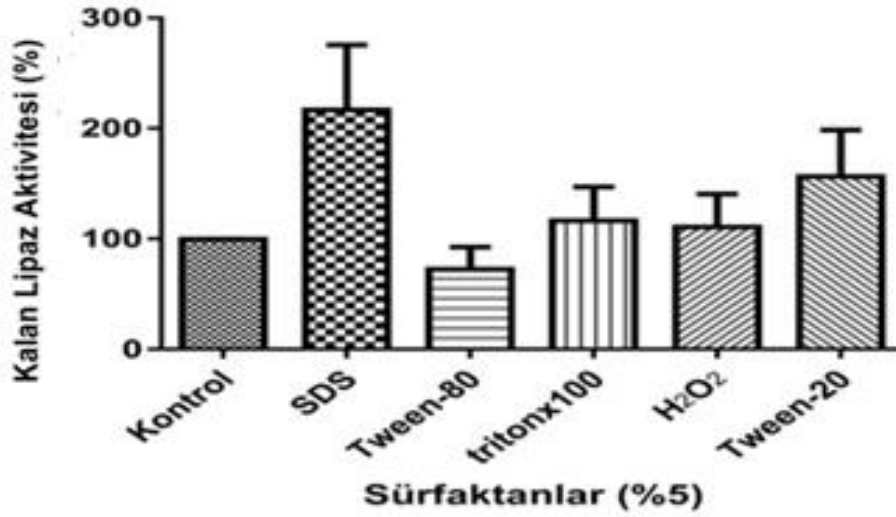
Organik Çözücüler	%25’lik Konsantrasyon	%50’lik Konsantrasyon
DMSO	7,203±7,203	25,97±1,139
Etanol	0	125,7±1,277 (n=3)
Metanol	0	13,7±6,199 (n=3)
Tert-Bütanol	4,69±4,69	36,8±6,832 (n=3)
İzo-propanol	0	0
Aseton	64,48±6,67	8,79±8,79 (n=3)
Kloroform	212,3±43,85	224,3±10,66 (n=3)
Gliserol	0	23,92±1,972 (n=3)
Bütanol	0	0

***A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi üzerine sürfaktanların ve okside edici ajanın etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar**

Saflaştırılan lipaz enzimi üzerine etkisini belirlemek için sürfaktanların etkisini belirlemek için %1’lik ve %5’lik konsantrasyonlarda SDS, Triton X-100, Tween 20 ve Tween 80 çözeltileri hazırlanarak kullanıldı. Yapılan deneylerin sonuçlarından elde edilen verilere göre Triton X-100’ün %1’lik konsantrasyonunda aktivitenin %69’u korunurken, Tween 80’in %1’lik konsantrasyonunda %144, Tween 20’nin %1’lik konsantrasyonunda %57 ve SDS’nin %1’lik konsantrasyonunda ise, aktivitenin %61 arttığı belirlendi. Tween 80’in %5’lik konsantrasyonunda, aktivitenin aynı oranda muhafaza edildiği ve Tween 20’nin %5’lik konsantrasyonunda ise aktivitenin tam olarak %101 oranında artarak 2 katına çıktığı; SDS’nin %5’lik konsantrasyonu varlığında ise, aktivitenin %179 arttığı belirlendi. Okside edici ajan olan H₂O₂’nin her iki konsantrasyonunda ise, mevcut aktivitenin %37 oranında arttığı tespit edildi. Elde edilen sonuçlar **Şekil 24** ve **Şekil 25**’de gösterildi.



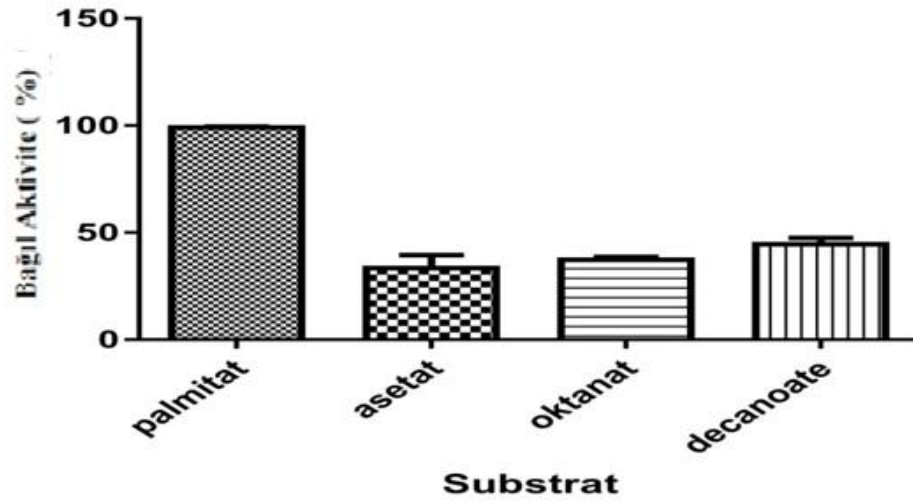
Şekil 24. Lipaz enzimi üzerine bazı süpfaktanların ve okside edici ajanın etkisi (%1'lik konsantrasyon)



Şekil 25. Lipaz enzimi üzerine süpfaktanların ve okside edici ajanın etkisi (%5'lik konsantrasyon)

***A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin substrat spesifitesini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar**

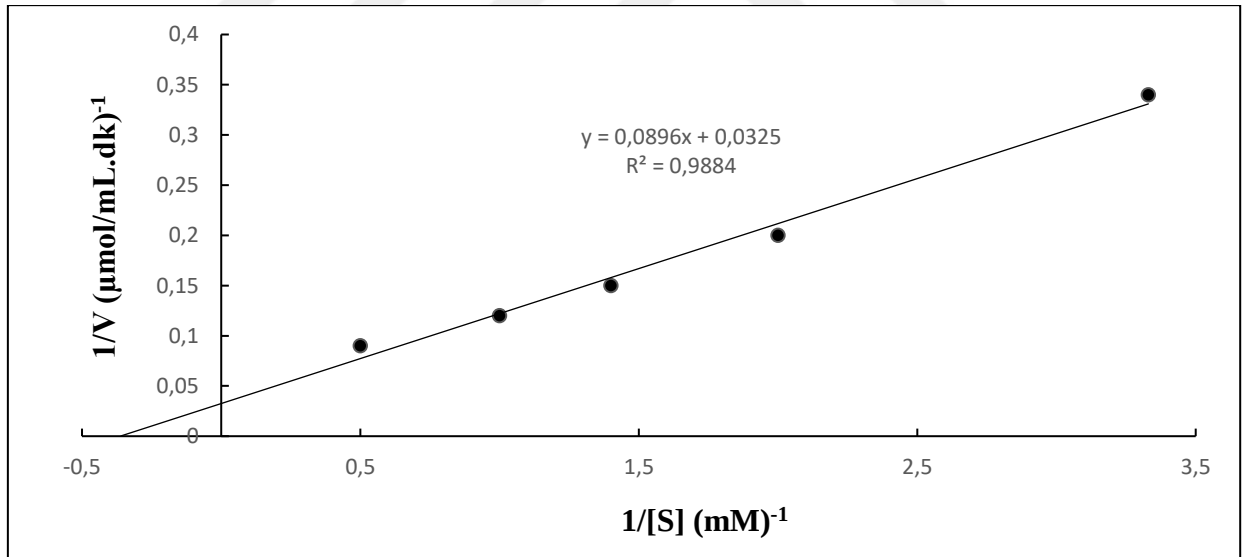
A.pallidus IO3'ten saflaştırılan lipaz enzimin paranitrofenol palmitat, paranitrofenil asetat, paranitrofenil oktanat ve paranitrofenil decanoate gibi substratların varlığında aktivitesi lipaz enzimi aktivite tayini metodu ile incelendi. Enzimin en yüksek aktiviteyi paranitrofenol palmitat substratı ile gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar **Şekil 26**'da gösterildi.



Şekil 26. Lipaz enziminin substrat spesifitesi için aktivite sonuçları

K_m ve V_{max} parametrelerinin bulunmasına yönelik sonuçlar

A.pallidus IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin paranitrofenol palmitat substratı varlığında K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten faydalanılarak K_m değeri 2,75 mM ve V_{max} değeri ise, 30,77 $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{dk}^{-1}$ olarak bulundu. Elde edilen sonuçlar Şekil 27’de gösterildi.



Şekil 27. Lipaz enziminin K_m ve V_{max} parametrelerinin belirlenmesine yönelik Lineweaver-Burk grafiği

***A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enzimi aktivitesi üzerine bazı endüstriyel deterjanların etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışma sonuçları**

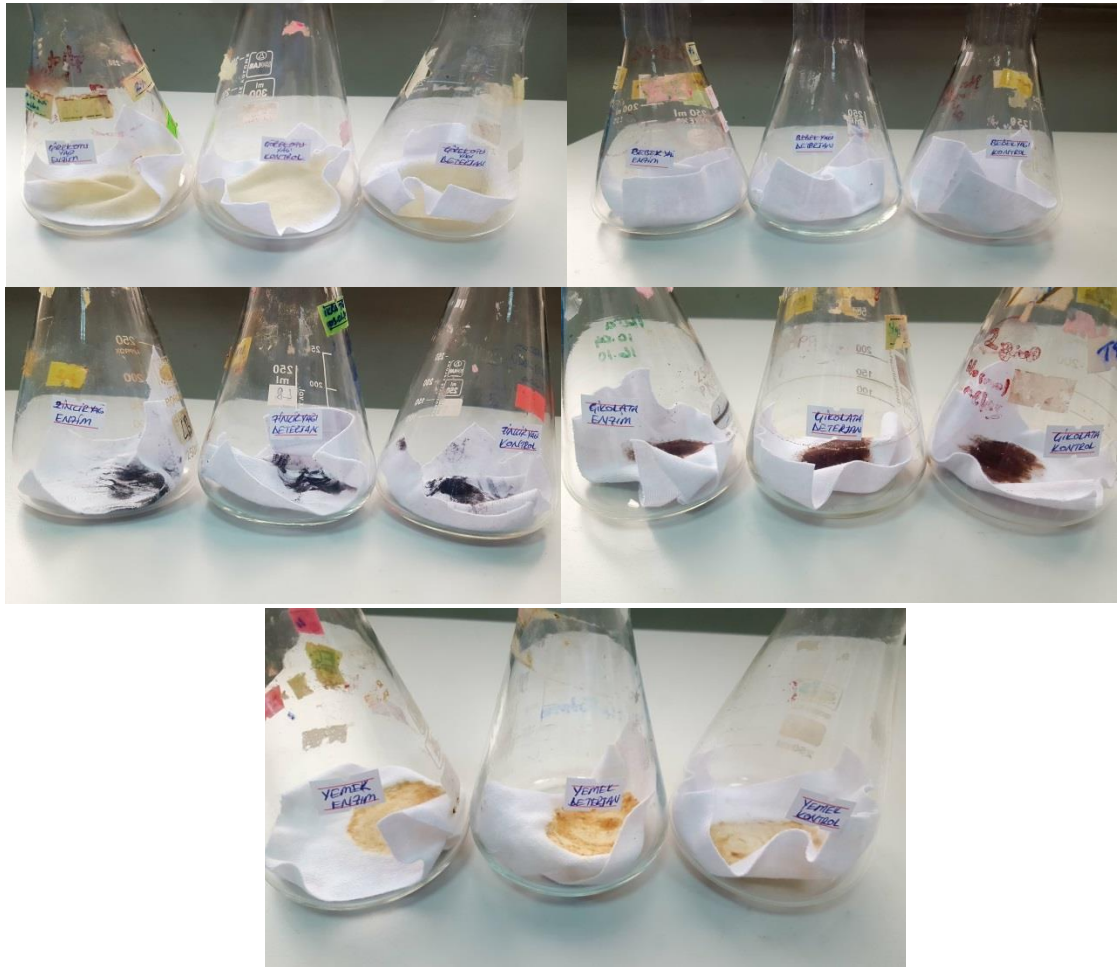
Ticari olarak satılan deterjanların etkisini belirlemek için yapılan inceleme sonucunda saflaştırılan enzimin en yüksek aktiviteyi sıvı deterjanlardan endüstriyel deterjan 2’de (OMO Sıvı Deterjanda) gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 14 ile gösterildi.

Tablo 14. Lipaz enziminin ticari deterjanlarda aktivite durumu

Deterjan	Kalan Aktivite (%)
OMO Katı Deterjan END. 1	1,87
OMO Sıvı Deterjan END. 2	86,07
ARİEL Katı Deterjan END. 3	37,97
ARİEL Sıvı Deterjan END. 4	60,62
ALO Katı Deterjan END. 5	70,14
BOR ON Katı Deterjan END. 6	12,02

Yağ lekelerinin gideriminde saflaştırılan lipaz enziminin etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların sonuçları

Çeşitli leke türleri ile hazırlanan kare şeklindeki kumaşların enzim, deterjan ve kontrol grupları ile muamele edilip, 50°C’de, 1 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen değerlendirmelere göre; Tris-HCl tamponu (pH: 8,0, 50 mM) ile hazırlanan enzim çözeltisinin, çörek otu yağı, bebek yağı gibi bitkisel özellikli yağ lekelerini belirgin seviyede giderdiği, katı nitelikli yemek yağı, makine zincir yağı ve çikolata lekelerinde ise çok etkili olmadığı (lekeyi yaydığı) belirlendi (Şekil 29 – Şekil 33).



Şekil 28. Çörekotu yağı, bebek yağı, zincir yağı, çikolata ve yemek yağı lekelerinin hazırlanması (resimlerdeki sırasıyla)

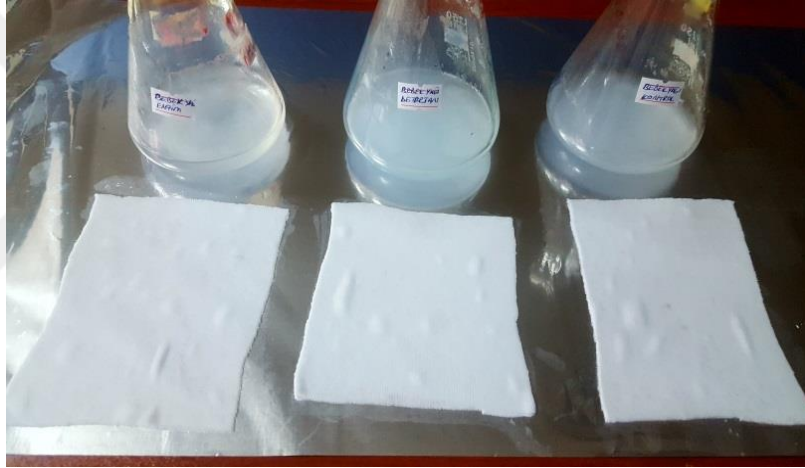


ENZİM

DETERJAN

KONTROL

Şekil 29. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin çörekotu yağı lekesi üzerine etkisi

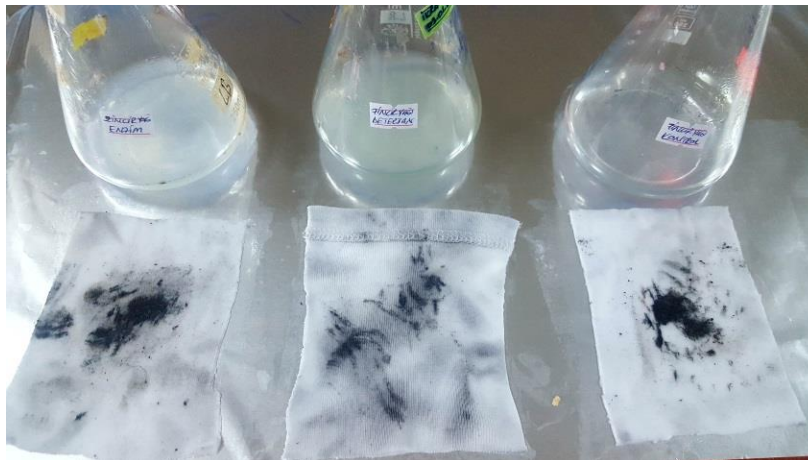


ENZİM

DETERJAN

KONTROL

Şekil 30. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin bebek yağı lekesi üzerine etkisi

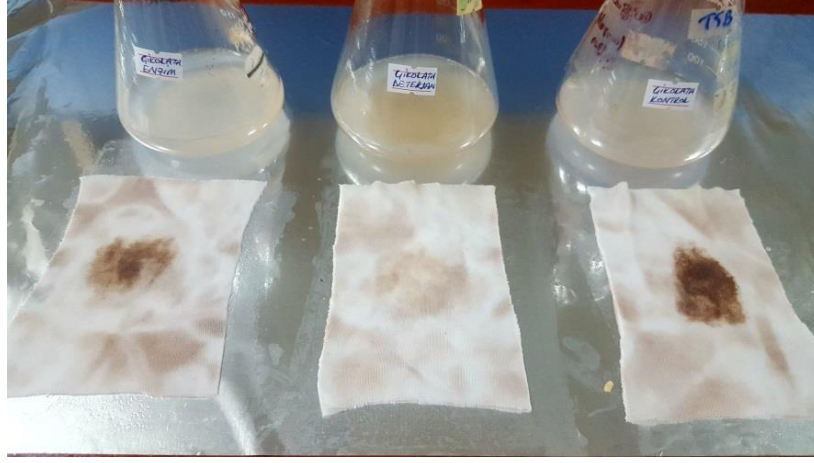


ENZİM

DETERJAN

KONTROL

Şekil 31. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin makine ve bisiklet zincir yağı lekesi üzerine etkisi

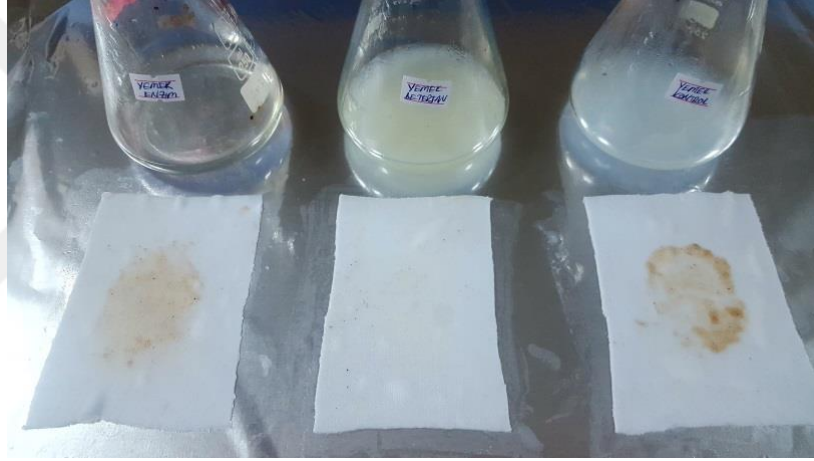


ENZİM

DETERJAN

KONTROL

Şekil 32. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin çikolata lekesi üzerine etkisi



ENZİM

DETERJAN

KONTROL

Şekil 33. Saflaştırılan lipaz enzim çözeltisinin yağlı yemek lekesi üzerine etkisi

TARTIŞMA SONUÇ

Termofilik mikroorganizmalar, optimum gelişme sıcaklıkları 45°C-105°C arasında olan, büyük bir kısmı Bakteria domaini canlıları içerisinde yer alan ve bazı türleri ekstremofilik özellik gösteren mikroorganizma grubudur. Bu organizmalar doğal olarak kaplıcalarda, hidrotermal menfezlerde, tropikal topraklarda, çöllerde, gübre yığınlarında ve sıcak su kaynaklarında bulunmaktadır. Bu tür koşullarda yaşayan mikroorganizmaların keşfedilmesiyle biyoteknolojik açıdan önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

Özellikle; termofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, yüksek sıcaklık şartlarına dayanabilmeleri, stabil oldukları için uzun süre kullanım imkanı sunmaları, daha az yan ürün oluşturmaları ve genel olarak üretim proseslerinde fazla miktarda, yüksek saflıkta üretilmelerinden dolayı psikrofilik ve mezofilik mikroorganizmalardan elde edilen enzimlere kıyasla daha fazla tercih edilmektedir (Gül Güven 2011). Bundan dolayı günümüzde termofilik mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu ve endüstriyel açıdan önemli enzimlerini saflaştırılması ve biyoteknolojik uygulanabilirliğinin tespitine yönelik çalışmalarda ciddi bir artış meydana gelmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan bu tez çalışmasında; Erzurum ili, Ilıca İlçe Kaplıcası'ndan alınan su ve çamur örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra bu bakteriler içerisinde en yüksek lipaz enzim aktivitesi gösteren izolat seçilip, konvensiyonel ve moleküler yöntemler ile tanısı gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda; test suşunun, çubuk hücre morfolojisine sahip, hareketli, gram, katalaz ve endospor pozitif olduğu tespit edildi. Galbis *et al.* (2004) ve Yasawong *et al.* (2011) yapmış oldukları çalışmalarda, izole ettikleri *Aeribacillus pallidus* türlerinin çubuk şekilli, hareketli, gram, katalaz ve endospor pozitif olduklarını bildirmişlerdir. Bu yönüyle verilerimiz literatür verileriyle uyumaktadır.

Test suşunun, fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen analizler sonucunda; IO3 izolatının gelişebildiği tuz konsantrasyonun %2-4 olduğu, Literatür verileri incelendiğinde Yasawong *et al.* (2011), izole ettikleri *Aeribacillus pallidus* türünün maksimum %4 tuz konsantrasyonunda yaşayabildiğini bildirmiştir. İzolatın optimum gelişme gösterdiği sıcaklık değerinin 55°C olduğu belirlenmiştir. Bu yönüyle sonuçlarımız literatür verileriyle paralellik göstermektedir. Fakat, Scholz *et. al* (1987) yılında yapmış oldukları çalışmada *Aeribacillus pallidus* DSM 3670^T suşunun maksimum 70°C'de üreyebildiğini

bildirmişlerdir. IO3 izolatının ise, 65°C’de gelişebildiği tespit edilmiştir. Sonuçlarımız bu yönüyle literatür verileriyle paralellik göstermektedir.

Gerçekleştirdiğimiz tez çalışması kapsamında, IO3 mikroorganizmasının izolasyonu termal kaplıcalardan gerçekleştirilmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalarda, sıcak su kaplıcalarından *Aeribacillus palidus* türüne ait çok sayıda bakteriyal suş buralardan izole edilmiştir (Scholz *et al.* 1987; Yasawong *et al.* 2011; Baltacı *ve ark.* 2016).

Çalışmamızın ilerleyen aşamalarında ise; lipaz petri denemeleri sonucu en büyük zonu oluşturduğu tespit edilen IO3 kodlu bakterinin (*A.pallidus*) tanısını yapıp GenBank Numarası aldığımız *A. pallidus* IO3 (GenBank NO:MT705737) bakterisinden, lipaz enziminin çeşitli metotlar ile saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla iki farklı strateji ile saflaştırma işlemi yapıldı. Birinci strateji olarak; amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini içeren 3 adımlı bir saflaştırma yapıldı. İkinci strateji olarak ise; tek adımda, TPP yöntemiyle saflaştırma gerçekleştirildi.

Sıvı lipaz besiyerinde büyütülüp gelişim gösteren *A. pallidus* IO3 bakterisi tarafından üretilen lipaz enziminin eldesi için, ilk olarak kültürün santrifüjle çöktürülmesi, elde edilen homojenata, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulandı ve homojenata uygulanan %60 amonyum sülfat tuzu ile enzimin %16,86 verimle 0,66 kat saflaştırılması gerçekleştirildi. Literatüre göre ise; Basu *et al.* (2007) %60 amonyum sülfat ile %65,96 verimle 4,31 kat, Rao *et al.* (2008) %60 amonyum sülfat ile %62,2 verimle 2,2 kat, Divakar *et al.* (2010) %30-60 amonyum sülfat ile %67,2 verimle 6 kat, Raut *et al.* (2012) %30-80 amonyum sülfat ile %76,2 verimle 1,18 kat ve Malekabadi *et. al* (2018) %80 amonyum sülfat ile %63 verimle 10,06 kat olarak enzim saflaştırması yapmışlardır. Bu tez kapsamında kısmi saflaştırma aşaması için, verilerimiz literatür ile uyumludur.

Saflaştırma işlemine kromatografik yöntemlerle devam edildi. Mikrobiyal kaynaklı lipazların saflaştırılması için genellikle iyon değişim, jel filtrasyon kromatografisi gibi farklı kromatografik teknikler kullanılmaktadır (Scopes 1994). Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyalizin ardından enzim çözeltisine ilk olarak iyon değişim kolon kromatografisi saflaştırma yöntemi uygulandı. *A.pallidus* IO3’ün lipaz enzimi Q-sefaroze iyon değişim kolonuna tatbik edildi ve uygulanan bu kromatografik işlem sonunda; 0,07 EU/mg spesifik aktiviteyle, %4,98 verimle 1,16 kat olarak enzim saflaştırıldı. Ardından; Sefadex G-100 jel filtrasyon kolonuna iyon değişim sonunda elde edilen enzim çözeltisi verildi. Jel filtrasyon kolonu sonunda, enzim 0,56 EU/mg spesifik aktivite, %3,18 verimle 9,3 kat saflaştırıldı. Lipazın saflaştırılmasında Q-Sepharose (Nawani *et al.* 2006; Sharma *et al.* 2008), *Geobacillus stearothermophilus*’un lipaz enzimi iyon değişim (Q-Sepharose), jel filtrasyon (Sephadex G-100), hidroksil apatit

kromatografileri ile saflaştırılmış ve spesifik aktiviteleri sırasıyla; 157,03 U/mg, 340 U/mg ve 579,22 U/mg olarak bulunmuştur (Sifour 2010). Balan (2012), *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL suşunun lipazını ise, ultrafiltrasyon, Heparin-afinite ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanarak %9 verimle 34 kat saflaştırmıştır. Bir başka çalışmada ise; *Bacillus stearothermophilus* MC7'den lipaz enzimi, ultrafiltrasyon işleminden sonra, Sefadeks G-200 ve DEAE-Selüloz kolonları kullanılarak, sırasıyla; %10.2 verimle 19.25 kat saflaştırılmıştır (Kambourova *et al.* 2003). İkinci bir strateji olarak, çalışma kapsamında tercih edilen TPP metodu ile; ara fazdan, %38,79 verimle, 1,54 kat olarak enzimin ara fazdan saflaştırılması yapıldı.

Gerçekleştirdiğimiz çalışma kapsamında ise; *A. pallidus* IO3 lipazının kromatografik yöntemler ile saflaştırılmasında; enzim, %3,18 verimle 9,3 kat saflaştırılırken; alternatif ve yeni metot olan TPP ile, %38,79 verimle, 1,54 kat saflaştırılmıştır. Basit, tek adımlık, yüksek oranda ürün miktarı sağlayan, hem maliyet yönünden hem de zaman yönüyle tasarruf oluşturan TPP metoduna kıyasla, geleneksel prosesler olan kromatografik yöntemlerde ise, verim ve saflaştırılma oranı açısından bakıldığında; düşük verimle, daha yüksek oranda saflık ile lipaz enziminin elde edilmesi sağlanmıştır.

Saflaştırma işlemlerinden sonra, *A.pallidus* IO3 lipazının saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerini tayin etmek amacıyla; SDS PAGE ve gümüş boyama işlemleri uygulandı. *Aeribacillus pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin molekül kütlesi yaklaşık olarak 33,88 kDa olarak belirlendi. Lipazlar, molekül ağırlıkları 11-92 kDa arasında değişen proteinlerdir ve tek polipeptid zincirinden oluşurlar (Lawson *et al.* 1994; Schmid and Verger 1998). Molekül ağırlığı, 92 kDa olan lipaz enzimi *Pseudomonas gessardii* suşundan (Ramani *et al.* 2010) saflaştırılmıştır. *Aspergillus carneus*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 27 kDa (Saxena *et al.* 2003), *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 ve *Rhizopus oryzae* suşlarından saflaştırılan lipazın molekül kütlesi 32 kDa (Cao *et al.* 2012), *Aeromonas caviae* AU04 suşundan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 39 kDa (Velu *et al.* 2012), *Bacillus coagulans* BTS-3'dan saflaştırılan lipaz enziminin molekül ağırlığı 31 kDa (Kumar *et al.* 2005), *Bacillus stearothermophilus* P1 ve *Geococcus* sp. SBS-4S'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 43 kDa (Dheeman *et al.* 2011; Tayyab *et al.* 2011) *Staphylococcus* sp. ve *Yarrowia lipolytica*'dan saflaştırılan lipazın molekül ağırlığı 38 kDa (Daoud *et al.* 2013) olarak bulunmuştur.

Proteinlerin farklı amaçlar için farklı alanlarda kullanılmak üzere saflaştırılmaları gereklidir. Hücrelerde pekçok farklı çeşit protein içeriği vardır ve bunlardan sadece birinin saflaştırılması o proteinin diğer proteinlerden farklı özelliklerinin olmasıyla

gerçekleştirilebilir. Enzim saflaştırmanın temel stratejisi, en düşük maliyetle en yüksek saflık oranına ulaşmaktır. Çünkü saflaştırma stratejisinde maliyet ve zaman oldukça önemlidir. Enzim saflaştırmasında önemsenmesi gereken bir husus da enzim aktivitesinin korunmasıdır (Erarslan ve ark. 2008). Hedef enzim saflaştırılırken enzimin kaynağına göre farklı yöntemler seçilebilir. Ayrıca enzimin intraselüler veya ekstraselüler oluşu da metodun ilk adımını belirlemeyi sağlar. Asıl saflaştırma aşamasında ise en yüksek saflaştırma oranına sahip yöntemler genellikle kromatografik yöntemlerdir. Kromatografi yöntemler ve amonyum sülfat çöktürmesi gibi metotlar geleneksel yöntemlerdir ve bu geleneksel protein saflaştırma yöntemlerine kıyasla TPP gibi alternatif teknikler, protein saflaştırmada uygulanan hızlı, etkili ve yeni bir yöntemdir. Yöntemin temeli, ham enzim çözeltisine yüksek konsantrasyonda amonyum sülfatın ve suda çözünürlüğü kısıtlı olan alifatik bir alkolün (genellikle *t*-bütanol) ilavesiyle yapılır. TPP metodu geleneksel yöntemlere göre protein saflaştırılmasında kısa süreli bir prosese sahiptir, ucuz ve bulunabilmesi kolay olan kimyasallar kullanılır; yani ekonomik bir yöntemdir. TPP metodunun kromatografik yöntemlere göre başka bir avantajı ise ham ekstrata direkt olarak küçük ve büyük ölçeklerde uygulanabilir. Oysa geleneksel yöntemler olan kromatografik metotlar küçük ölçeklerde, çalışma sonunda az enzim miktarı oluşturabilen düşük verimli yüksek saflaştırma oranına sahip olan yöntemlerdir. Gerçekleştirilen tez kapsamında; geleneksel metotlardan olan amonyum sülfat çöktürmesi ile *A.palliudus* lipazı %16,86 verimle 0,66 kat saflaştırılmışken; iyon değişim kromatografisi ile %4,98 verimle 1,16 kat saflaştırılmış olup, jel filtrasyon kromatografisi sonunda ise; %3,18 verimle 9,3 kat saflaştırıldı. Bunlara kıyasla alternatif ve avantajlı metot olan TPP ile *A.pallidus* lipazı %38,79 verimle 1,54 kat saflaştırıldı.

Bakteriyal lipazların çoğu, genellikle nötral ve alkali pH değerlerinde optimum aktivite gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Gupta 2004). Yapılan araştırmalara göre ise alkali ve nötral pH şartları bakteri ve mayalarda lipaz üretimini teşvik etmektedir (Ramakrishnan *et al.* 2016, Bharathi *et al.* 2018). Asidik pH ise fungal lipaz üretimi için gerekli olmaktadır (Turati *et al.* 2019). Bununla birlikte *Bacillus stearothermophilus* SB-1, *B.atrophaeus* SB-2 ve *B. licheniformis* SB-3 suşlarından elde edilen lipazlar pH: 3,0-12,0 aralığında aktivite göstermişlerdir. *B. licheniformis* MTCC-10498 maksimum lipaz aktivitesini pH 7,5’da göstermiştir (Sharma *et al.* 2012). *G. stearothermophilus* AH22 suşundan kısmi olarak saflaştırılan lipaz için aktivitenin pH’ya olan bağıllığı pH: 4,0-12,0 aralığında hazırlanan farklı tampon çözeltileri ile denenmiş ve en yüksek aktiviteyi pH: 8,0’da verdiği bildirilmiştir (Ekinci 2015). Bunlarla birlikte literatürde yapılan incelemelere göre *Bacillus megaterium* M22 lipazının optimum pH değeri 7,0 Tekiner (2011) tarafından ve *Pseudomonas* sp. lipazının pH: 8,0-9,0 aralığında aktivite gösterdiği Kiran *et al.* (2008)

tarafından belirlenmiştir. Saflaştırma işlemi çalışma kapsamında gerçekleştirilen lipaz enziminin ise pH: 8,0'da maksimum aktiviteyi göstererek literatür verileriyle uyuluk gösterdiği açıktır. *A.pallidus* IO3 lipazının pH kararlılığını incelemek amacıyla, enzim 50 mM'lık konsantrasyonunda pH: 4,0-12,0 arasındaki tampon çözeltileri ile 1 saat inkübe edildi. *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipazın geniş bir pH aralığında (pH: 5,0-12,0) aktivitesinin yaklaşık olarak %60'ını koruyarak yüksek kararlılık gösterdiği gözlemlendi.

Bakteriyel lipazlar genellikle 30-60°C arasında optimum sıcaklığa sahipken aktivite gösterebildiği daha düşük veya daha yüksek sıcaklık aralıkları da literatürde mevcuttur (Gupta and Punj 2006). Tez kapsamında ise *A.pallidus* IO3 suşundan saflaştırılan lipaz enziminin aktivite değişimi farklı sıcaklık değerlerinin aktivitesi belirlemek amacıyla, *p*-nitrofenol palmitat substratıyla 20-80°C sıcaklık aralıklarında incelendi. Enzimin optimum çalışma sıcaklığı 50°C olarak belirlendi. Ayrıca *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipazın ısı kararlılığını incelemek amacıyla enzimin; 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda 30, 60, 90 ve 120 dk boyunca değişen sürelerde inkübasyonu gerçekleştirildi 40, 50 ve 60°C'de aktivitenin yaklaşık olarak %70'inin, 30, 60, 90 ve 120 dakikalık süreleri boyunca 70°C'de yaklaşık olarak %65'inin, 80°C'de ise %60'inin korunduğu gözlemlendi. Özellikle ise, enzimin tüm sıcaklık aralıklarında aktivitesini %50 oranında korunduğu gözlemlendi. Benzer şekilde yapılan literatür incelemeleri ile, *B. megaterium* M22'den saflaştırılan lipaz enziminin optimum sıcaklığı 40°C (Tekiner 2011), *B. licheniformis* MTCC 6824 lipazının optimum sıcaklığı yine 40°C (Chakraborty and Raj 2008) *B. licheniformis* RSP-09 lipazının optimum sıcaklığı 40°C (Madan and Mishra 2010), *Bacillus* sp. L2, *G. stearothermophilus* ve *Geobacillus* sp. T1 lipazının optimum sıcaklığı 70°C (Berekaa 2009) *B. stearothermophilus* P1 ve *Staphylococcus aureus* lipazlarının optimum sıcaklığı 50°C (Kumar and Nussinov 2001; Litthauer *et al.* 2002), *Geobacillus* sp. SBS-4S, *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 ve *Thermomyces lanuginosus* lipazlarının optimum sıcaklığı 60°C (Dheeman *et al.* 2011; Tayyab *et al.* 2011; Zheng *et al.* 2011) *Acinetobacter radioresistens* CMC-1 lipazının optimum sıcaklığı ise 40°C (Chang and Hong 1998) olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda; saflaştırdığımız lipaz enzimin optimum sıcaklığı literatürle uyumludur. Isıl kararlılık açısından ise *Aeromonas caviae* AU04 lipazının 40 ve 50 °C'de 3 saat inkübasyonundan sonra sırasıyla %98 ve %75 olarak aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Velu *et al.* 2012).

Metal iyonları, proteinlerin çoğunda üç boyutlu yapıların oluşturulmasında ve aktif merkezde, alınan substratların katalizlerinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli rol oynamaktadırlar. Bazı enzimler, aktiviteleri için kofaktör olarak metal iyonlarına ihtiyaç

duyarlar. Bu sebeple metal iyonları proteinler karşısında farklı özellikler gösterebilir ve proteinlerin farklı bölgelerine bağlanabilirler. Bunun sonucunda da enzim aktivitesini farklı şekillerde etkileyebilirler. Lipaz aktivitesi genel olarak Ni^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} ve Sn^{2+} gibi ağır metaller tarafından inhibe edilir (Patkar and Bjorkling 1994). *A.pallidus* IO3 lipazının aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla; Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Li^+ , K^+ ve Fe^{3+} metal iyonlarının klorürlü ve sülfatlı tuzlarının farklı çözeltileri ile konsantrasyonları 1 mM ve 10 mM olacak şekilde ilave edilerek optimum şartlar altında enzim aktivitesi için çözeltileri hazırlandı ve enzim çözeltisi ile muamele edilerek aktivite tayinleri yapıldı. Ca^{2+} metal iyonunda 1mM konsantrasyonda aktivitesinin %98'ini koruduğu, Cu^{2+} ve Li^+ metal iyonlarının mevcut aktiviteyi, 1mM ve 10mM konsantrasyonlarda çift sıralı olarak %85, %30 oranında artırdığı ve %50, %55 oranında muhafaza ettiği; Co^{2+} ve Fe^{2+} 'nin %18 ile %133 oranında artırdığı tespit edildi. K^+ ve Li^+ metal iyonlarının aktiviteyi yarı yarıya düşürdüğü gözlemlendi. Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} ve Fe^{3+} gibi metal iyonlarının kullanıldığı, bir başka çalışma kapsamında ise, Li^+ 'nin 1 ve 10 mM'lık konsantrasyonunda aktivitenin %98 ve %101 oranında korunduğu, K^+ metal iyon ile %90 oranında aktivitenin korunduğu, Co^{2+} iyonunun 1 mM konsantrasyonun aktivitenin %84,2'si korunup, 10 mM konsantrasyonunda ise aktivitenin yarıyarıya düştüğü bildirilmiştir (Malekabadi *et al.* 2018). Mevcut literatür çalışması ile *G. stearothermophilus* AH22 lipazının Hg^{+2} ve Zn^{+2} ile inhibe olurken; Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ve Fe^{2+} aktive olduğu bildirilmiştir (Ekinci 2015). *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının aktivitesinin Zn^{2+} ile arttığı, K^+ ile aktivitesinde değişme olmadığı, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} ve Cu^{2+} ile aktivitesinin azaldığı belirlenip bildirilmiştir (Tarakçıoğlu 2016).

İnhibe edici bazı kimyasal ajanların *A.pallidus* IO3 bakterisi lipazının aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; PMSF, β -merkaptotanol, DNTB, IAA ve EDTA'nın 1 ve 10 mM'lık konsantrasyondaki çözeltileri kullanıldı. β -Merkaptaetanol varlığında aktivitenin sadece 1 mM'lık konsantrasyonda %23'ü, 10 mM'lık konsantrasyonda ise %7'sini korunduğu ve bunun dışında diğer inhibe edici ajanlar ile enzimin tamamen inhibe olduğu gözlemlendi. β -merkaptotanol Ekinci (2015) tarafından yapılan çalışmada lipazı aktive ederken, EDTA ve β -merkaptotanol ile *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Tarakçıoğlu 2016). Literatür kapsamında buunan çalışmada β -Merkaptaetanol varlığında aktivitenin ortalama %70 oranında korunduğu, EDTA varlığında ise aktivitenin %54 oranında muhafaza edildiği bildirilmiştir (Malekabadi *et al.* 2018).

Lipazlar organik çözücülerde genellikle kararlı olan, geniş substrat spesifitesine sahip endüstriyel biyoteknolojideki önemli biyokatalistlerdir (Jeager and Reetz 1998; A. Sharma *et al.* 2018). Lipazlar protein yapılı olduğundan bazı organik çözücüler yapılarında denatürasyona ve konformasyonel değişikliklere sebep olabilmektedir; bu durum lipazların katalitik aktivite ve fonksiyonlarını etkiler (Guo *et al.* 2015). Organik çözücüler varlığında kararlılığını koruyan enzimlerin biyokatalizör olarak kullanılmaları endüstriyel ve biyoteknolojik açıdan oldukça önem arz eder. Bu tür enzimlerin sentetik biyoteknoloji alanında kullanışlı olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmektedir. Gerçekleştirilen çalışma kapsamında *A.pallidus* IO3 bakterisinden saflaştırılan lipaz enziminin aktivitesi üzerine DMSO, etanol, metanol, gliserol, izo-propanol, aseton, bütanol, *t*-bütanol ve kloroform organik çözücülerin etkisi incelendi. Enzimin %25 konsantrasyonluk organik çözücülerde 1 saatlik inkübayonu sonucunda aktivitesinde DMSO, etanol, *t*-bütanolün varlığında %70-90 arasında korunma olduğu, izopropanol ve kloroform organik çözücülerine karşı ise aktivitesinde %10-33 artma olduğu gözlemlendi. %25'lik konsantrasyonda metanol, aseton, gliserol ve bütanol varlığında aktivitede büyük oranda azalma görüldü. Çalışma kapsamında kullanılan organik çözücülerin %50'lik konsantrasyonlarında 1 saatlik inkübasyonu sonucunda enzim aktivitesinde etanolde %30'luk bir artma görülürken; kloroform mevcut aktiviteyi artırmada çok büyük oranda etkili olup, %338 oranda artış gerçekleştirmiştir. Geriye kalan organik çözücülerde aktivitede büyük miktarda azalma veya lipaz enzimin aktivitesinde azalma söz konusu olduğu bulundu. 24 saatlik inkübasyon sonunda %25'lik ve %50'lik konsantrasyonda aktivitede etanol ve kloroform organik çözücüler varlığında artma belirlenirken; çalışma kapsamında kullanılan diğer organik çözücülerde aktivite azalması ve inhibisyonu tespit edildi. (Malekabadi *et al.* 2018)'nin yaptıkları çalışmada organik çözücülerin *B. Licheniformis* KM12 suşından saflaştırdıkları lipaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve organik çözücülerin lipaz aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Bu bilgi ile paralel olarak kloroform ve etanol varlığında saflaştırdığımız lipaz enziminin aktivite yönüyle uyum gösterdiği görülmektedir (Malekabadi *et al.* 2018). *Acinetobacter*'in alt suşlarıyla yapılan çalışmada etanol, izopropanol ve asetonun lipaz aktivitesini bir miktar artırdığı, metanoün ise aktiviteyi değıştirmedığı bulunmuştur (Khoramnia *et al.* 2011). *Pseudomonas* suşlarıyla yapılan çalışmada ise izopropanolün lipaz aktivitesini önemli ölçüde artırdığı ve bütanol organik çözücüsünün aktiviteyi bir miktar azalttığı bildirilmiştir (Boran 2008).

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında Triton X-100, Tween 20, Tween 80 ve SDS yüzey aktif maddelerinin %1'lik ve %5'lik konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltileri ile enzim çözeltisinin muamelesi ve inkübasyonu sonucunda Tween 20 ve SDS sürfaktanlarda aktivitenin sırasıyla %60 ve %100-%179 oranında arttığı belirlendi. Tween 80 ve Triton X-

100 yüzey aktif maddelerinde ise aktivitenin ciddi anlamda ve büyük oranda korunduğu tespit edildi. *G. stearothermophilus* AH22 suşundan saflaştırılan lipaz enziminin Triton X-114, Triton X-100, Tween-80 ve SDS sürfaktanları ile büyük oranda inhibe olduğu, Triton X-100, Tween-80, Tween-20 ve SDS'nin ise *B. thermoamylovorans* ST-10 lipazının aktivitesini yüksek oranda düşürdüğü tarafından bildirilmiştir (Ekinci 2015; Tarakçıoğlu 2016). Yine Tween 20'nin %0,1 ve %1,0'lık konsantrasyonunda *B.licheniformis* KM12 lipazının aktivitesini %110 artırdığı, Triton X-100'ün ve SDS'nin ise aktiviteyi ortaklama olarak %101 oranında artırdığı bildirilmiştir (Malekabadi et. al 2018). Gerçekleştirilen çalışma kapsamında okside edici ajan olan H₂O₂ varlığında enzim aktivitesinin ortalama olarak %137 oranında korunduğu belirlendi. Literatürde ise, H₂O₂'nin varlığında; *B.licheniformis* KM12 lipazının aktivitesinin %0,1 konsantrasyonda; %92 oranında korunduğu ve %1,0'lık konsantrasyonda ise, %78,6 oranında aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Malekabadi et al. 2018) Sürfaktanların varlığında; genel olarak ise %5'lik gibi yüksek konsantrasyonlarında aktivitenin arttığı görüldü (Ekinci 2015).

A.pallidus IO3 lipazı için en uygun substratı ve substrat konsantrasyonunu belirlemek amacıyla; olacak şekilde *p*-nitrofenil asetat, *p*-nitrofenil oktaonat, *p*-nitrofenil dekonat ve *p*-nitrofenol palmitat substratları kullanıldı. Sırasıyla %32, %37, %44 ve %99 oranında aktivite tespit edildi. En yüksek konsantrasyonu veren substratın *p*-nitrofenol palmitat substratı olduğu belirlendikten sonra, değişen konsantrasyonlarda (0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1 ve 2 mM) substrat içeren bir dizi reaksiyon karışımında aktivite ölçümleri yapıldı. Lipaz aktivitesinin substratın artan konsantrasyonlarda aktivitesini kademeli olarak artırdığı gözlemlendi. Bu substrat için elde edilen verilerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. K_m değeri 2,75 mM ve V_{max} değeri ise 30,77 $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak bulundu. K_m değeri enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür ve ne kadar küçük olursa enzimin substrata olan ilgisinin o kadar büyük olduğunu gösterir. Bu sonuçlara göre kullanılan *p*-nitrofenol palmitat substratının, literatürdeki çalışmalar incelendiğinde substrat olarak *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) kullanılan çalışmalarda; K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla *Mucor hiemalis f. corticola* lipazı için 1,327 mM ve 91,11 $\mu\text{mol.dk}^{-1}$ (Ülker ve Karaoğlu 2012), *A. mediterranei* DSM 43304 lipazı için 0,099 mM ve 2,53 mmol $\text{dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (Dheeman 2011) ve *Spirulina platensis* lipazı için 0,02 mM ve 38,9 $\mu\text{mol. dk}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ (Saygıdeğer Demir ve Tükel 2010) olarak bildirilmiştir.

Hidrolitik lipazların temel ticari uygulamasını, toplam lipaz satışının yaklaşık % 32'sini oluşturan leke giderme ve çamaşır deterjanlarında kullanılması kapsar. Novo Nordisk ilk ticari rekombinant lipaz olan "Lipolaz"ı 1994 yılında *Thermomyces lanuginosus*

mantarından izole etmiştir ve *Aspergillus oryzae* 'de eksprese etmiştir. Protein mühendisliği ve çeşitli kaynaklardan edibilen yöntemlerle istenilen özelliklere sahip lipazların değerli birer araç olduğu gösterilmiştir (Wang *et al.* 1995). Deterjanlarda kullanılan enzimler lekeleri daha basit formlara dönüştürerek temizleyiciler tarafından uzaklaştırılmalarını kolaylaştırır. Lipazlar, tri, mono ve digliseritleri, gliserol ve serbest yağ asitlerine dönüştürür. Oluşan bu ürünlerin hepsi başlangıç materyali olan yağdan daha çok suda çözünürler ve böylece uzaklaştırılmaları daha kolaylaşır (Hasan *et al.* 2006). Bu tez çalışmasında *A. pallidus* IO3'ten saflaştırılan lipaz enzimi üzerine ticari olarak satılan katı ve sıvı deterjanların etkisi tek tek incelendi. Bunun için Ariel, ALO, OMO ve BOR ON markalı katı deterjanlar ile Ariel ve OMO markalı sıvı deterjanlar kullanıldı. Özellikle OMO ve Ariel markalı sıvı deterjanlarda aktivitenin sırasıyla %86 ve %60 oranlarında; ALO katı deterjanında aktivitenin %70 oranında korunduğu belirlendi. Enzim en fazla stabiliteyi sıvı deterjanlardan OMO, katı deterjanlardan ALO deterjan varlığında verdiği gösterdi. Yapılan bir başka çalışma kapsamında ise, 5 farklı yerel ticari deterjanlar varlığında *B.licheniformis* KM12 lipazının mevcut aktivitesinin muhafaza edildiği bildirilmiştir (Malekabadi *et al.* 2018). Bu çalışmada, *A.pallidus* IO3'ten saflaştırılan lipaz enziminin katı yağ içeren yağlı yemek, kozmetikte kullanılan bebek yağı, bitkisel nitelikli çörekotu yağı, içerisinde kakao yağı bulunduran ve günlük hayatta en çok karşılaşılan leke türü olan çikolata ve iş makineleri ile bisikletlerin zincirlerinin yağlanması için kullanılan makine zincir yağı lekelerinin giderimi üzerine etkileri araştırıldı. Bunun için; kontrol grubu; pH: 8,0 Tris-HCl tamponu ve saf su karışımı, deterjan grubu; 1 mL deterjan, pH: 8,0 Tris-HCl tamponu ve saf su karışımı, enzim grubu; 1 mL enzim, pH: 8,0 Tris-HCl tamponu ve saf su karışımı oluşturularak belirtilen leke grupları üzerine enzimin optimum sıcaklığı olan 50°C'de denemeler yapıldı. 1 saatlik çalkalamalı inkübasyon süresi sonunda leke grupları tek tek incelenerek görüntüleri alındı. Elde edilen verilere göre tampon ile seyreltilerek oluşturulmuş saflaştırılmış lipaz enziminin en iyi sonucu katı yağ içeren yemek yağı, bitkisel nitelikli kakao yağı içeren çikolata lekesi, kozmetikte kullanılan bebek yağı lekesi ve yine bitkisel nitelikli olan çörekotu yağı lekesinde gösterdiği; leke gideriminde bu bağlamda etkili olduğu görüldü. Kontrol grubuna ve deterjan grubuna kıyasla elde edilen sonuçlarda enzimin gerekli deterjan koşulları oluşturularak hayvansal yağ ve bitkisel yağ içeren yağ lekesi gruplarında etkili olduğundan; deterjan ve leke giderme hususunda endüstriyel anlamda protein mühendisliği ile geliştirilerek ve aktivitesini artıracak olan sürfaktan madde grupları ile birarada kullanılarak fonksiyonel özelliğinin artırılıp kullanılabileceği söylenebilir. Çalışma içerisinde hayvansal ve bitkisel nitelikli lekeler kendi içlerinde kıyaslandığında ise saflaştırılan lipaz enziminin yoğun olarak bitkisel nitelikli lekelerle karşı giderici özellikte olduğu görülmektedir. Yapılan bu çalışma kapsamında *A.*

pallidus IO3'ten saflaştırılan lipaz enziminin 40-50°C gibi genel yıkama işlemlerinin gerçekleştirildiği sıcaklık değerlerinde özellikle bitkisel lekeleri etkili bir şekilde giderdiği görülmektedir.

Sonuç olarak; bu tez çalışması kapsamında termal kaynaktan elde edilen sıcak su ve çamur örneklerinden toplamda 11 adet bakteri izole edildi. Konvensiyonel ve moleküler testlerle IO3 izolatinin identifikasyonu gerçekleştirildi. Bu tez kapsamında *A. pallidus* IO3 'ten lipaz enzimi hem TPP yöntemiyle hem de geleneksel metotlar olan kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı. TPP ile yapılan saflaştırmada %40 amonyum sülfat; 1,0:1,0 (homojenat: *t*-bütanol) oranında *t*-bütanol, pH: 7,0'de %38,79 verimle 1,54 kat saflaştırma gerçekleştirildi. Geleneksel yöntemler ise; ilk olarak iyon değişim kolonundan %4,98 verimle 1,16 kat; sonrasında uygulanan jel filtrasyon kolonu ile %3,18 verimle 9,3 kat saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi. Enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH'sının sırasıyla 50°C ve 8,0 olduğu tespit edildi. Aynı zamanda 20-80°C değerlerindeki sıcaklık aralığında 30, 60, 90 ve 120 dakikalık inkübasyon sonucunda enzimin kararlılığını koruduğu belirlendi. Enzimin pH: 5,0-12,0 arasında aktivitesinin %60'ının stabil kaldığı yapılan uygulamalar sonucunda görüldü. Bu durum da enzimin değişken pH koşullarında hem endüstriyel hem ticari hem de biyoteknolojik olarak tercih edilebileceğini göstermektedir. Enzim metal iyonları ile farklı konsantrasyonlarda muamele edildiğinde Cu^{2+} 'nın 1 mM'lık ve 10 mM'lık konsantrasyonda lipaz enziminin aktivitesini sırasıyla %185 ve %130 artırdığı; Fe^{3+} 'nın 1 mM'lık konsantrasyonunda lipaz enzimi mevcut aktivitesini %180 artırdığı; Zn^{2+} 'ın 1 mM'lık konsantrasyonunda ise enzimin mevcut aktivitesini %106 artırdığı; Mn^{2+} ve Co^{2+} 'nın 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesini sırasıyla %109 ve %118 oranında artırdığı tespit edildi. Yaptığımız çalışmada saflaştırılan lipaz enzime organik çözücülerin etkisi incelendiğinde etanol ve kloroformun enzimin aktivitesini artırdığı, DMSO ve *t*-bütanolün düşük konsantrasyonlarında ise %75 oranında kararlılığını devam ettirdiği görüldü. *A.pallidus* IO3'ten saflaştırılan lipaz enziminin en iyi substrat spesifitesini *p*-nitrofenol palmitata karşı gösterdiği belirlendi. Enzimin ticari olarak satılan deterjanlar varlığında stabilitesini koruması ve aktivitesini artırması onun iyi bir deterjan katkı maddesi olarak endüstriyel alanda kullanım potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Tüm bu bilgiler ışında gerçekleştirilen çalışma ile endüstriyel ve biyoteknolojik açıdan önemli olan, çevre dostu enzim üretme potansiyeli bulunan suş veya suşların literatüre kazandırılması yolunda ilerleme kaydedilmiştir. Özellikle biyoteknolojik alanda kullanılabilecek ve endüstriyel açıdan önemi olan enzim ve enzim sistemlerini birarada eksprese edebilen suşların belirlenmesi, hem bilimsel yönden hem de enzimin sahip olduğu özelliklerle ticari açıdan oldukça önemlidir.

KAYNAKLAR

- Abbas, S. M. N., Halkman, A.K., 2004. "Antimicrobial Effect of Water Extract of Sumac (*Rhus corlarla* L.) on the Growth of Some Food-Borne Bacteria Including Pathogens." *International of Food Microbiology* 97(1): 63-69.
- Adıgüzel, A. (2006). Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 5).
- Adıgüzel, A., Inan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce, M., Beldüz, A. O., Barış, Ö. (2011). Molecular diversity of thermophilic bacteria isolated from Pasinler hot spring (Erzurum, Turkey). *Turkish Journal of Biology*, 35(3), 267-274.
- Adiguzel, A., Nadaroglu, H., Adiguzel, G. (2015). Purification and characterization of β -mannanase from *Bacillus pumilus* (M27) and its applications in some fruit juices. *Journal of food science and technology*, 52(8), 5292-5298.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of microbiological methods*, 79(3), 321-328.
- Akmoussi-Toumi, S., Khemili-Talbi, S., Ferioun, I., Kebbouche-Gana, S. (2018). Purification and characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from *Haloferax mediterranei* CNCMM 50101. *International journal of biological macromolecules*, 116, 817-830.
- Akhmaloka, A. S., S. Nurbaiti, I. N. Tika and F. M. Warganegara, 2006. "Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium From Papandayan Crater." *Proceeding ITB on Engineering Sciences*, 38B:1, 110.
- Albayrak, Ş., 2018. Türkiye'nin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvensiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açısından Önemli olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alçiçek, E. 2017. Van İlinden Alınan Sıcak su örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, *Bacillus licheniformis* E10'dan Proteaz Enziminin Üçlü Faz Sistemiyle(TPP) ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Arslan, S., 2017. Türkiye'nin Farklı Yörelerinden Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aulakh, S. S., Prakash, R. (2010). Optimization of medium and process parameters for the production of lipase from an oil-tolerant *Aspergillus* sp.(RBD-01). *Journal of basic microbiology*, 50(1), 37-42.
- Avhad, M. R., Marchetti, J. M. (2019). Uses of enzymes for biodiesel production. In *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts* (pp. 135-152). Woodhead Publishing.
- Balan, A., Ibrahim, D., Abdul Rahim, R., Ahmad Rashid, F. A. (2012). Purification and characterization of a thermostable lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra. *Enzyme research*, 2012.
- Baltacı, M. Ö., 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Baltacı, M. O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, G., Adiguzel, A. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnologically important enzyme production. *Geomicrobiology journal*, 34(1), 53-62.
- Bayramoğlu, G., Arica, M. Y. (2009). Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu (II), Zn (II) and Ni (II): kinetics and equilibrium studies. *Bioresource technology*, 100(1), 186-193.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102(2), 133-153.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.
- Berekaa, M. M., Zaghloul, T. I., Abdel-Fattah, Y. R., Saeed, H. M., Sifour, M. (2009). Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 287-294.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., Komathi, S. (2019). Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 898-901.
- Bose, H., Satyanarayana, T. (2016). Suitability of the alkalistable carbonic anhydrase from a polyextremophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* TSHB1 in biomimetic carbon sequestration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(10), 1515-1525.
- Boran, R. (2008). *Pseudomonas spp.’de Lipaz Enzimi Üzerine Çalışmalar (Yüksek Lisans Tezi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla, Türkiye).*
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Caccamo, D., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C. (2001). Identification of thermophilic and marine bacilli from shallow thermal vents by restriction analysis of their amplified 16S rDNA. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 520-524.
- Cao, X. Z., Liu, F., Li, S. X., Wu, P., Li, L. L. (2012). Study on properties of esterifying enzyme from *Rhizopus*. *Int. J. Food Nutr. Safety*, 1, 137-143.
- Castilla, A., Panizza, P., Rodríguez, D., Bonino, L., Díaz, P., Irazoqui, G., Giordano, S. R. (2017). A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII). *Enzyme and microbial technology*, 98, 86-95.
- Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R. O. (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(6), 648-654.
- Chakraborty, K., Raj, R. P. (2008). An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: purification and biochemical characterization. *Food chemistry*, 109(4), 727-736.
- Chen, G. S., Segel, I. H. (1968). Purification and properties of glycogen phosphorylase from *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 127, 175-186.
- Chiou, S. H., Wu, W. T. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, 25(2), 197-204.
- Chrisnasari, R., Verina, D., Tapatfeto, A. C., Pranata, S., Patjajani, T., Wahjudi, M., Purwanto, M. G. M. (2018). Isolating and characterising chitinolytic thermophilic bacteria from Cangar Hot Spring, East Java. *Pertanika Journal Tropical and Agricultural Science*, 41(3), 1437-1448.
- Cihan, A. C., Ozcan, B., Tekin, N., Cokmus, C. (2011). Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11), 2683.

- Cihan, A. C., Tekin, N., Ozcan, B., Cokmus, C. (2012). The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ardra analyses isolated from geothermal regions of turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 309-324.
- Colla, L. M., Primaz, A. L., Benedetti, S., Loss, R. A., de Lima, M., Reinehr, C. O., Costa, J. A. V. (2016). Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *brazilian journal of microbiology*, 47(2), 461-467.
- Coradi, G. V., da Visitação, V. L., de Lima, E. A., Saito, L. Y. T., Palmieri, D. A., Takita, M. A., de Lima, V. M. G. (2013). Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Annals of microbiology*, 63(2), 533-540.
- Costa, T. M., Hermann, K. L., Garcia-Roman, M., Valle, R. D. C. S. C., Tavares, L. B. B. (2017). Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(2), 419-427.
- da Silva, M. A. C., Cavalett, A., Spinner, A., Rosa, D. C., Jasper, R. B., Quecine, M. C., de Souza Lima, A. O. (2013). Phylogenetic identification of marine bacteria isolated from deep-sea sediments of the eastern South Atlantic Ocean. *SpringerPlus*, 2(1), 1-10.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., Aloulou, A. (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International journal of biological macromolecules*, 57, 232-237.
- de Macario, E. C., Macario, A. J. (2000). Stressors, stress and survival: overview. *Front Biosci*, 5, D780-D786.
- Deive, F. J., Álvarez, M. S., Morán, P., Sanromán, M. Á., Longo, M. A. (2012). A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(6), 931-941.
- Deive, F. J., Angeles Sanromán, M., Longo, M. A. (2009). Evaluation of a novel *Bacillus* strain from a north-western Spain hot spring as a source of extracellular thermostable lipase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(10), 1509-1515.
- Demir, B. S., Tükel, S. S. (2010). Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4), 123-128.
- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F., Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles, *Curr. Opin. Chem Biol* 2001, 5:144-151.
- Derya, Y., Ahmet, A. (2014). Molecular typing of thermophilic bacilli isolated from different hot springs of Turkey. *Research Journal of Biotechnology* Vol, 9, 10.
- Dheeman, D. S., Henahan, G. T., Frías, J. M. (2011). Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. *Bioresource technology*, 102(3), 3373-3379.
- Divakar, K., Priya, J. D. A., Gautam, P. (2010). Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(3-4), 311-318.
- Divya, K., Padma, P. N. (2015). Psychrophilic yeast isolates for cold-active lipase production. *Int. J. Sci. Prog. Res*, 10, 93-97.
- Dizge, N., Aydinler, C., Imer, D. Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., Keskinler, B. (2009). Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource technology*, 100(6), 1983-1991.
- Doukyu, N., Ogino, H. (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical engineering journal*, 48(3), 270-282.

- Dror, A., Kanteev, M., Kagan, I., Gihaz, S., Shahar, A., Fishman, A. (2015). Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(22), 9449-9461.
- Dunlap, C. A., Kwon, S. W., Rooney, A. P., Kim, S. J. (2015). *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10), 3487-3492.
- Dutta, S., Ray, L. (2009). Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C 7. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(1), 142-154.
- Ekinci, A. P. (2015). *Geobacillus stearothermophilus* AH22 suşundan lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya Anabilim Dalı).
- Ekinci, A. P., Dinçer, B., Baltaş, N., Adıgüzel, A. (2016). Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(2), 325-331.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G., Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149(3), 720-724.
- Erarslan A, Kazan D, Denizci AA, Öztürk DC, Karahan N, 2008. Tubitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Enzim Saflaştırmada Temel Yöntemler VIII. Uygulamalı Eğitim Kursu Kitabı, 175s.
- Fekkes, P., Driessen, A. J. (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 161-173.
- Filippidou, S., Jaussi, M., Junier, T., Wunderlin, T., Jeanneret, N., Palmieri, F., Chain, P. S. (2016). *Anoxybacillus geothermalis* sp. nov., a facultatively anaerobic, endospore-forming bacterium isolated from mineral deposits in a geothermal station. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 2944-2951.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., Davidson, S. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Science Progress (1933-)*, 119-157.
- Gomes, J., Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology*, 42(4), 223-225.
- Gowthami, P., Muthukumar, K., Velan, M. (2015). Utilization of coconut oil cake for the production of lipase using *Bacillus coagulans* VKI1. *Biocontrol Science*, 20(2), 125-133.
- Goyal, N., Gupta, J. K., Soni, S. K. (2005). A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(7), 723-734.
- Gross, R., Kalra, B., Kumar, A. (2001). Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(6), 655-660.
- Gulmus, E. O., Gormez, A. (2020). Identification and characterization of novel thermophilic bacteria from hot Springs, Erzurum, Turkey. *Current Microbiology*, 1-9.
- Guncheva, M., Zhiryakova, D. (2011). Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 1-21.
- Gupta, R. S. (1998). Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1435-1491.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763-781.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*.

- Güven, R. G. (2011). Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR, 9(1), 1-10.
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource technology*, 89(1), 17-34.
- Hasan, F., Khan, S., Shah, A. A., Hameed, A. (2009). Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pak. J. Bot*, 41(3), 1499-1510.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39(2), 235-251.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 27(6), 782-798.
- Hatzinikolaou, D. G., Macris, J. B., Christakopoulos, P., Kekos, D., Kolisis, F. N., Fountoukidis, G. (1996). Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 18(5), 547-552.
- Herbert, R. A., Sharp, R. J. (1992). Molecular biology and biotechnology of extremophiles.
- Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., Comeau, L. C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and microbial technology*, 26(5-6), 421-430.
- Holst, O., Manelius, Å., Krahe, M., Märkl, H., Raven, N., Sharp, R. (1997). Thermophiles and fermentation technology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(3), 415-422.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 118(1-3), 155-170.
- Hong, M. C., Chang, M. C. (1998). Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Acinetobacter radioresistens* CMC-1. *Biotechnology letters*, 20(11), 1027-1029.
- Huang, J., Xia, J., Jiang, W., Li, Y., Li, J. (2015). Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase. *Bioresource Technology*, 180, 47-53.
- Hung, T. C., Giridhar, R., Chiou, S. H., Wu, W. T. (2003). Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26(1-2), 69-78.
- Iizumi, T., Nakamura, K., Fukase, T. (1990). Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(5), 1253-1258.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), 53-58.
- Jaeger, K. E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 390-397.
- Jaeger, K. E., Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9), 396-403.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A. (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(5-6), 307-313.
- Kanwar, L., Gogoi, B. K., Goswami, P. (2002). Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource technology*, 84(3), 207-211.
- Kapoor, M., Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.
- Katı, H.; Karaca, B.; Gülşen, Ş.H., 2013. SAÜ Fen Bilimleri Dergisi, 281-90.

- Kaur, G., Singh, A., Sharma, R., Sharma, V., Verma, S., Sharma, P. K. (2016). Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India. 3 Biotech, 6(1), 49.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif yayınevi, 89-137, Erzurum Yayını-Ankara.
- Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 5, 16.
- Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B. K., Lai, O. M. (2011). Production of a solvent, detergent, and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. in submerged and solid-state fermentations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. (2000). *Practical streptomyces genetics* (Vol. 291). Norwich: John Innes Foundation.
- Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, S., Natarajaseenivasan, K. (2008). Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp.(MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(5), 483-492.
- Koç, M., *Geobacillus* türlerinde termotabil lipaz üretimi Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ktata, A., Karray, A., Mnif, I., Bezzine, S. (2020). Enhancement of *Aeribacillus pallidus* strain VP3 lipase catalytic activity through optimization of medium composition using Box-Behnken design and its application in detergent formulations. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Kumar, A., Kanwar, S. S. (2012). Lipase production in solid-state fermentation (SSF): recent developments and biotechnological applications. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 6(1), 13-27.
- Kumar, S., Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat?. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(9), 1216-1233.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lan, D., Qu, M., Yang, B., Wang, Y. (2016). Enhancing production of lipase MAS1 from marine *Streptomyces* sp. strain in *Pichia pastoris* by chaperones co-expression. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 62-67.
- Lawson, D. M., Brzozowski, A. M., Rety, S., Verma, C., Dodson, G. G. (1994). Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(4), 543-550.
- Leathers, T. D., Rich, J. O., Anderson, A. M., Manitchotpsit, P. (2013). Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology letters*, 35(10), 1701-1706.
- Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C., Lakshmipriya, T., Tang, T. H. (2015). Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed research international*, 1-9.
- Lee, J. C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., Adams, J. L. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors—mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacology & therapeutics*, 82(2-3), 389-397.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2499-2508.

- Litthauer, D., Ginster, A., van Eeden Skein, E. (2002). *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 209-215.
- López-García, P. (1999). DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life?. *Journal of molecular evolution*, 49(4), 439-452.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca, S., Valero, F., Lafuente, J. (1998). Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and physics of lipids*, 93(1-2), 143-148.
- Macario, A. J., de Macario, E. C. (2002). Sick chaperones and ageing: a perspective. *Ageing research reviews*, 1(2), 295-311.
- Macrae, A. R., Hammond, R. C. (1985). Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3(1), 193-218.
- Mishra B., Madan P. (2010). Overexpression, purification and characterization of organic solvent stable lipase from *Bacillus licheniformis* RSP-09. *J Mol Microbiol Biotechnol* 17:118–123
- Malekabadi, S., Badoei-dalfard, A., Karami, Z. (2018). Biochemical characterization of a novel cold-active, halophilic and organic solvent-tolerant lipase from *B. licheniformis* KM12 with potential application for biodiesel production. *International journal of biological macromolecules*, 109, 389-398.
- Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., Berzano, M. (2002). The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 4(10), 595-602.
- Masomian, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Basri, M. (2016). Analysis of comparative sequence and genomic data to verify phylogenetic relationship and explore a new subfamily of bacterial lipases. *PloS one*, 11(3), e0149851.
- Matsumoto, T., Takahashi, S., Kaieda, M., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., Kondo, A. (2001). Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(4), 515-520.
- Mechri, S., Berrouina, M. B. E., Benmrar, M. O., Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Moujehed, E., Jaouadi, B. (2017). Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. *International journal of biological macromolecules*, 94, 221-232.
- Minana-Galbis, D., Pinzon, D. L., Loren, J. G., Manresa, A., Oliart-Ros, R. M. (2010). Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz *et al.* 1988) Banat *et al.* 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(7), 1600-1604.
- Mnif, S., Sayadi, S., Chamkha, M. (2014). Biodegradative potential and characterization of a novel aromatic-degrading bacterium isolated from a geothermal oil field under saline and thermophilic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 258-264.
- Moftah, O. A. S., Grbavčić, S., Žuža, M., Luković, N., Bezbradica, D., Knežević-Jugović, Z. (2012). Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(2), 348-364.
- Mouad, A. M., Taupin, D., Lehr, L., Yvergnaux, F., Porto, A. L. M. (2016). Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126, 64-68.
- Muhammad, S. A., Ahmed, S. (2015). Production and characterization of a new antibacterial peptide obtained from *Aeribacillus pallidus* SAT4. *Biotechnology Reports*, 8, 72-80.

- Nadeem, H., Rashid, M. H., Siddique, M. H., Azeem, F., Muzammil, S., Javed, M. R., Riaz, M. (2015). Microbial invertases: a review on kinetics, thermodynamics, physiochemical properties. *Process Biochemistry*, 50(8), 1202-1210.
- Nadeem, U., Muhammad, D., Muhammad, S., Özkan, A. T., Sami, U., Muhammad, Q. (2015). Screening identification and characterization of lipase producing soil bacteria from Upper Dir and Mardan Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 6(2), 49-55.
- Nagarajan, S. (2012). New tools for exploring “old friends—microbial lipases”. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(5), 1163-1196.
- Namsaraev, Z. B., Babasanova, O. B., Dunaevsky, Y. E., Akimov, V. N., Barkhutova, D. D., Gorlenko, V. M., Namsaraev, B. B. (2010). *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, central Mongolia. *Microbiology*, 79(4), 491-499.
- Nardini, M., Dijkstra, B. W. (1999). α/β -Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology*, 9(6), 732-737.
- Nasar-Abbas, S. M., Halkman, A. K. (2004). Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *International journal of food microbiology*, 97(1), 63-69.
- Nawani, N., Kaur, J. (2007). Studies on lipolytic isoenzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 881-887.
- Nawani, N., Khurana, J., Kaur, J. (2006). A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290(1-2), 17-22.
- Neelam, D. K., Agrawal, A., Tomer, A. K., Dadheech, P. K. (2018). Characterization, Phylogenetic Analysis and Potential Applications of Heterotrophic Bacteria Inhabit Sand Dunes of Thar Desert, India. *J Pure Appl Microbiol*, 12(4), 1887-1894.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 711-729.
- Önal, S. (2010). Enzimler, Bölüm 8. Moleküler Biyoloji, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Ankara, 249-296.
- Öztaş, E., 2017. Erzurum ili sıcak su kaynaklarından termofilik bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Öztekin A., 2011. Tirit mantarından (*Lactarius volemus*) bazı vitaminlerle (a, e, c), proteaz enziminin tanımlanması ve enzimin endüstriyel uygulanabilirliğinin 1989. 'Large Increases in General Stability for Subtilisin Bpn' through Incremental Changes in the Free-Energy of Unfolding', *Biochemistry*, 7205-13.
- Panda, M. K., Sahu, M. K., Tayung, K. (2013). Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. with protease activity isolated from hot spring of Tarabalo, Odisha, India. *Iranian journal of microbiology*, 5(2), 159-165.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry*, 29(2), 119-131.
- Pandey, N., Dhakar, K., Jain, R., Pandey, A. (2016). Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium*. *Mycosphere*, 7(10), 1533-1545.
- Parra, L. P., Espina, G., Devia, J., Salazar, O., Andrews, B., Asenjo, J. A. (2015). Identification of lipase encoding genes from Antarctic seawater bacteria using degenerate primers: expression of a cold-active lipase with high specific activity. *Enzyme and microbial technology*, 68, 56-61.

- Patkar SA, Bjorkling F (1994) Lipase inhibitors. In: Woolley P, Petersen SB (eds) Lipases—their structure, biochemistry and application. Cambridge University Press, Cambridge, pp 207–224
- Rahman, R. N. Z. R. A., Baharum, S. N., Salleh, A. B., Basri, M. (2006). S5 lipase: an organic solvent tolerant enzyme. *The Journal of Microbiology*, 44(6), 583-590.
- Rajan, A., Kumar, D. S., Nair, A. J. (2011). Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPTLC. *Int. J. Biol. Chem*, 5(2), 116-126.
- Ramakrishnan, V., Goveas, L. C., Suralikerimath, N., Jampani, C., Halami, P. M., Narayan, B. (2016). Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 6, 19-27.
- Ramani, K., Kennedy, L. J., Ramakrishnan, M., Sekaran, G. (2010). Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochemistry*, 45(10), 1683-1691.
- Ramani, K., Chockalingam, E., & Sekaran, G. (2010). Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(5), 531-535.
- Ramyasree, S., Dutta, J. R. (2013). The effect of process parameters in enhancement of lipase production by co-culture of lactic acid bacteria and their mutagenesis study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 393-398.
- Rao, C. S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R. S. (2009). Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44(3), 262-268.
- Rathi, P., Saxena, R. K., Gupta, R. (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37(2), 187-192.
- Raut, S., Sen, S. K., Kabir, N. A., Satpathy, S., Raut, S. (2012). Isolation and characterization of protease producing bacteria from upper respiratory tract of wild chicken. *Bioinformation*, 8(7), 326.
- Ravindran, B., Kumar, A. G., Bhavani, P. A., Sekaran, G. (2011). Solid-state fermentation for the production of alkaline protease by *Bacillus cereus* 1173900 using proteinaceous tannery solid waste. *Current science*, 726-730.
- Ray, A. (2012). Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and technology*, 2(2), 33-37.
- Ribeiro, B. D., Castro, A. M. D., Coelho, M. A. Z., Freire, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, 2011.
- Roger, V. L., Go, A. S., Lloyd-Jones, D. M., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Fox, C. S. (2012). Executive summary: heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 125(1), 188-197.
- Romero, C. M., Pera, L. M., Loto, F., Vallejos, C., Castro, G., Baigori, M. D. (2012). Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 25-31.
- Roy, M., Kumar, R., Ramteke, A., Sit, N. (2019). Identification of lipase producing fungus isolated from dairy waste contaminated soil and optimization of culture conditions for lipase production by the isolated fungus. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 698-704.
- Sahu, G. K., Martin, M. (2011). Optimization of growth conditions for the production of extracellular lipase by bacterial strains from dairy industry effluents. *Biotechnol Bioinf Bioeng*, 1(3), 305-311.

- Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., Salleh, H. M. (2012). Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36-44.
- Sangeetha, R., Geetha, A., Arulpandi, I. (2010). Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSG1: production, purification and characterization. *Brazilian journal of Microbiology*, 41(1), 179-185.
- Sarı, B., 2016. Rize Ayder Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Ksilanaz Enziminin *Geobacillus galactosidasius* BS61 Bakterisinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sari, E., Loğoglu, E., Öktemer, A. (2015). Purification and characterization of organic solvent stable serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus circulans* M34. *Biomedical Chromatography*, 29(9), 1356-1363.
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*, 34(1), 5-28.
- Saxena, R. K. (1999). Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Curr. Sci.*, 77, 101-115.
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of microbiological methods*, 52(1), 1-18.
- Demir, B. S., Tükel, S. S. (2010). Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4), 123-128.
- Segel, I. H. (1975). *Biochemical calculations*. Wiley.
- Scholz, T., Demharter, W., Hensel, R., Kandler, O. (1987). *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage. *Systematic and applied microbiology*, 9(1-2), 91-96.
- Schmid, R. D., Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12), 1608-1633.
- Scopes, P. P. (1994). *Principles of Affinity Chromatography. Principles and Practice*.
- Sharma Chander, K., Kanwar Shamsher, S. Purification of a Novel Thermophilic Lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498 ISCA, *J. Biological. Sci.* 3(2012) 43-48.
- Sharma, P. K., Singh, K., Singh, R., Capalash, N., Ali, A., Mohammad, O., Kaur, J. (2012). Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Molecular biology reports*, 39(3), 2795-2804.
- Sharma, A., Meena, K. R., Kanwar, S. S. (2018). Molecular characterization and bioinformatics studies of a lipase from *Bacillus thermoamylovorans* BHK67. *International journal of biological macromolecules*, 107, 2131-2140.
- Sharma, A., Pandey, A., Shouche, Y.S., Kumar, B., Kulkarni, G., 2008. "Characterization and identification of *Geobacillus* sp. isolated from Soldhar hot spring site of Garhwal Himalaya, India." *J. Basic Microbiol* 48: 1–8.
- Sharma, P., Sharma, N., Pathania, S., Handa, S. (2017). Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 369-377.
- Sifour, M., Zaghloul, T. I., Saeed, H. M., Berekaa, M. M., Abdel-fattah, Y. R. (2010). Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs. *New Biotechnology*, 27(4), 330-336.
- Shirazi, S. H., Rahman, S. R., Rahman, M. M. (1998). Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(4), 595-597.
- Singh, A. K., Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(2), 486-520.

- Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K., Gupta, R. (2006). A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(6), 679-682.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174.
- Silano, V., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Brüscheiler, B. J., Cocconcelli, P. S., Mortensen, A. (2019). Safety evaluation of the food enzyme 4- α -glucanotransferase from *Aeribacillus pallidus* (strain AE-SAS). *EFSA Journal*, 17(3), e05628.
- Stathopoulou, P. M., Savvides, A. L., Karagouni, A. D., Hatzinikolaou, D. G. (2013). Unraveling the lipolytic activity of thermophilic bacteria isolated from a volcanic environment. *BioMed research international*, 2013.
- Su, F., Peng, C., Li, G. L., Xu, L., Yan, Y. J. (2016). Biodiesel production from woody oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquid. *Renewable Energy*, 90, 329-335.
- Suci, M., Arbianti, R., Hermansyah, H. (2018, January). Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 105, No. 1, p. 012126). IOP Publishing Ltd.
- Svendsen, A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 223-238.
- Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Ariff, A. B., Ng, H. S., Bakar, M. H. A., Chow, Y. H. (2018). Extractive purification of recombinant thermostable lipase from fermentation broth of *Escherichia coli* using an aqueous polyethylene glycol impregnated resin system. *3 Biotech*, 8(6), 288.
- Tarakçıoğlu, S., 2016. Erzurum Ilıca Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST-10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taskesenligil E. 2018. *Aeromonas salmonicida* EDT1'den proteaz enziminin üçlü faz ayırma sistemi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Taslimi, P., Nadaroglu, H., Adıguzel, A. (2013). Removal of some textile dyes from aqueous solution by using a catalase-peroxidase from *Aeribacillus pallidus* (P26). *J Pure Appl Microbiol*, 7(4), 2629-2640.
- Tayyab, M., Rashid, N., Akhtar, M. (2011). Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: cloning and characterization of the lipase. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(3), 272-278.
- Tekiner, R., 2011. "Bacillus megaterium M22'den lipaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu."
- Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Al Nasr, K., Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular biotechnology*, 1-23.
- Thongekkaew, J., Boonchird, C. (2007). Molecular cloning and functional expression of a novel extracellular lipase from the thermotolerant yeast *Candida thermophila*. *FEMS yeast research*, 7(2), 232-243.
- Turati, D. F. M., Almeida, A. F., Terrone, C. C., Nascimento, J. M., Terrasan, C. R., Fernandez-Lorente, G., Carmona, E. C. (2019). Thermotolerant lipase from *Penicillium* sp. section *Gracilenta* CBMAI 1583: Effect of carbon sources on enzyme production, biochemical properties of crude and purified enzyme and substrate specificity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 15-24.
- Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E. N. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial cell factories*, 6(1), 9.

- Unni, K. N., Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., Benjamin, S. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* strain BUP2, a novel bacterium inhabiting the rumen of Malabari goat, produces an efficient lipase. *Biologia*, 71(4), 378-387.
- Ülker, S., Karaoğlu, Ş. A. (2012). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *Journal of bioscience and bioengineering*, 114(4), 385-390.
- Velu, N., Divakar, K., Nandhinidevi, G., Gautam, P. (2012). Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 45-50.
- Venugopal, M., Saramma, A. V. (2007). An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations. *Indian journal of microbiology*, 47(4), 298-303.
- Verma, M. L., Kanwar, S. S. (2008). Properties and application of Poly (MAc-co-DMA-cl-MBAm) hydrogel immobilized *Bacillus cereus* MTCC 8372 lipase for synthesis of geranyl acetate. *J. Appl. Polym. Sci*, 110, 837-846.
- Wang, S. L., Lin, Y. T., Liang, T. W., Chio, S. H., Ming, L. J., Wu, P. C. (2009). Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(1), 65-73.
- Whitford, D., 2005. *Proteins Structure and Function*. John Wiley & Sons, 9-37, England.
- Winkler, U. K., Stuckmann, M. A. R. T. I. N. A. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, 138(3), 663-670.
- Yang, H., Li, J., Shin, H. D., Du, G., Liu, L., Chen, J. (2014). Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 23-29.
- Yang, W., He, Y., Xu, L., Zhang, H., Yan, Y. (2016). A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126, 76-89.
- Yanmis, D., Baltaci, M. O., Gulluce, M., Adiguzel, A. (2015). Identification of thermophilic strains from geothermal areas in Turkey by using conventional and molecular techniques. *Res J Biotechnol*, 10(1), 39-45.
- Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S., Chansiri, K. (2011). Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao dam hot spring, Thailand. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5294-5303.
- Yıldırım, V., 2014. *Aeribacillus pallidus* C10'dan Alkalın Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik olarak Uygulanabilirliği Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yıldırım, V., Baltaci, M. O., Ozgencli, I., Sisecioglu, M., Adiguzel, A., Adiguzel, G. (2017). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 468-477.
- Yilmaz, B., Baltaci, M. O., Sisecioglu, M., Adiguzel, A. (2016). Thermotolerant alkaline protease enzyme from *Bacillus licheniformis* A10: purification, characterization, effects of surfactants and organic solvents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1241-1247.
- Zheng, X., Chu, X., Zhang, W., Wu, N., Fan, Y. (2011). A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene cloning and characterisation. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), 971-980.

Zhou, J., Chen, W., Jia, Z., Huang, G., Hong, Y., Tao, J., Luo, X. (2012). Purification and characterization of lipase produced by *Aspergillus oryzae* CJLU-31 isolated from waste cooking oily soil. American journal of food technology, 7(10), 596-608.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	İkra ÖZKAN
Doğum Tarihi:	06.06.1994
Doğum Yeri:	SAMSUN
Uyruğu:	T.C.
E-mail:	ikraozkan@ktu.edu.tr / ikra.istanbul@gmail.com
Eğitim Bilgileri	
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2017)
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (2020)